

**POIKIMISTA EDELTÄVÄN RUOKINNAN VAIKUTUS
LYPSYLEHMIEN RASVAKUDOKSEN ENERGIA-
AINEENVAIHDUNTAAN LIITTYVIEN GEENIEN TOIMINTAAN**

Katariina Vara
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kotieläinjalostus
2012

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

| | | | |
|---|--|--|--|
| Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta | | Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos | |
| Tekijä — Författare — Author Katariina Vara | | | |
| Työn nimi — Arbetets titel — Title Poikimista edeltävän ruokinnan vaikutus lypsylehmien rasvakudoksen energia- aineenvaihduntaan liittyvien geenien toimintaan | | | |
| Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläintiede | | | |
| Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma | Aika — Datum — Month and year Toukokuu 2012 | Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 50 | |
| <p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Tämän tutkielman tavoitteena oli analysoida geenitoiminnan muutosten avulla lypsylehmien ummessaoloajan energian saannin merkitystä metabolisen stressin ja insuliiniresistenssin voimakkuuteen. Poikiminen ja maidontuotannon käynnistyminen aiheuttavat negatiivisen energiataseen, mikä lisää rasvakudosten mobilisaatiota, metabolista stressiä ja insuliiniresistenssiä. Ummessaolokauden ruokinnasta saatavan korkean energian saannin sekä alkulaktaation korkean tuotostason on todettu lisäävän metabolista stressiä ja insuliiniresistenssiä.</p> <p>Tutkimukseen valittiin 14 geeniä, jotka koodaavat lipogeneesiin, lipolyysiin ja insuliinin signalointiin liittyviä proteiineja. Ihonalaisen rasvakudoksen geenitoiminnan muutoksia verrattiin laskennallisen energian tarpeen mukaan ruokittujen ja vapaasti ruokittujen kahdeksan lehmän ryhmien välillä. Laskennallisen energian tarpeen mukaan ruokittu ryhmä toimi kontrolliryhmänä. Kudosnäytteistä, jotka kerättiin -8pv, +1pv ja +9pv poikimisesta, syntetisoitiin cDNA:ta ja ne analysoitiin kvantitatiivisen PCR:n ja $2^{-\Delta\Delta C_T}$-menetelmän avulla.</p> <p>Koko aineistolla geenitoiminnassa havaittiin näytteenottopäivien välillä eroja seitsemällä geenillä. Aikavälillä ennen ja jälkeen poikimisen koko aineistolla ja kontrolliryhmällä havaittiin muutoksia geenitoiminnassa 11 ja koeryhmällä yhdellä geenillä. Merkitsevimpinä havaittiin <i>LEP</i>:n ja <i>SCD</i>:n muutos insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti. Ryhmien välillä havaittiin eroa <i>IRS1</i>:n geenitoiminnassa ennen poikimista, mikä viittaa koeryhmän olevan insuliiniresistentimpi. Poikimisen jälkeen geenitoiminnoissa ei havaittu merkitseviä eroja.</p> <p>Merkitsevimpinä havaitut geenitoiminnan muutokset olivat odotusten mukaisia liittyen maidontuotannon käynnistymiseen. Aikavälillä ennen ja jälkeen poikimisen kontrolliryhmällä havaittiin suurempia muutoksia geenitoiminnassa kuin koeryhmällä. Tulokset viittaavat siihen, että suuremman energian määrän ummessaolokaudella saavat lypsylehmät ovat insuliiniresistentimpiä jo ennen poikimista.</p> | | | |
| Avainsanat — Nyckelord — Keywords Metabolinen stressi, poikiminen, insuliiniresistenssi, geenitoiminta, ihonalainen rasvakudos | | | |
| Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto | | | |
| Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työtä ohjasi yliopistonlehtori Kari Elo | | | |

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

| | | | |
|---|---|--|--|
| Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry | | Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences | |
| Tekijä — Författare — Author Katariina Vara | | | |
| Työn nimi — Arbetets titel — Title The effect of pre-parturition feeding on the expression of genes related to energy metabolism in adipose tissue of dairy cows | | | |
| Oppiaine — Läroämne — Subject Animal Science | | | |
| Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis | Aika — Datum — Month and year May 2012 | Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 50 | |
| <p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>The main objective of this thesis was to analyse the impact of dry period energy intake on the intensity of metabolic stress and insulin resistance through changes in gene expression in dairy cows. Calving and beginning of lactation cause a negative energy balance which increases fat mobilization, metabolic stress and insulin resistance. These are intensified by high milk yield and excess energy intake from feed during the dry period.</p> <p>14 genes were selected for the analysis. These genes encode proteins that are linked to lipogenesis, lipolysis and insulin signaling. The changes in the gene expression of subcutaneous adipose tissue were compared between two groups of eight cows. The control group was fed according to the energy requirements while the test group was fed ad libitum. The biopsies were taken -8d, +1d and +9d from parturition, cDNA was synthesized from them and they were analysed by quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta C_T}$-method.</p> <p>There</p> <p>Expression differences were observed in seven genes within the whole data between biopsy dates. During the period from before to after parturition, differences were identified in the expression of 11 genes within the whole data and the control group, and one gene in the test group. The most significant differences were observed in <i>LEP</i> and <i>SCD</i> genes. Between the groups there was a difference in the gene expression of <i>IRS1</i> before parturition. This refers to the test group being more insulin resistant. After parturition there were no significant differences found in the gene expressions.</p> <p>The most significant changes observed in this study were as expected in early lactation. In the period between before and after parturition there were bigger changes in the gene expression observed in the control group than in the test group. The results indicate that cows getting more energy from their feed during the dry period are more insulin resistant before parturition.</p> | | | |
| Avainsanat — Nyckelord — Keywords Metabolic stress, parturition, insulin resistance, gene expression, subcutaneous adipose tissue | | | |
| Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library | | | |
| Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisor University Lecturer Kari Elo | | | |

SISÄLLYS

| | |
|---|-----------|
| LYHENTEET | 6 |
| 1 JOHDANTO | 7 |
| 2 KATSAUS KIRJALLISUUTEEN | 8 |
| 2.1 Lipogeneesi, lipolyysi ja insuliiniresistenssi | 8 |
| 2.2 Energiatase | 9 |
| 2.3 Rasvakudos ja sen tehtävät | 9 |
| 2.4 Tutkittavat geenit | 11 |
| 2.4.1 <i>ADIPOQ</i> | 11 |
| 2.4.2 <i>AR1</i> ja <i>AR2</i> | 11 |
| 2.4.3 <i>HSL</i> | 11 |
| 2.4.4 <i>IL6</i> | 12 |
| 2.4.5 <i>IRS1</i> | 12 |
| 2.4.6 <i>LEP</i> | 13 |
| 2.4.7 <i>LPL</i> | 13 |
| 2.4.8 <i>PCK1</i> | 13 |
| 2.4.9 <i>PPARγ</i> | 14 |
| 2.4.10 <i>RBP4</i> | 14 |
| 2.4.11 <i>RES</i> | 14 |
| 2.4.12 <i>SCD</i> | 15 |
| 2.4.13 <i>TNFα</i> | 15 |
| 3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET | 15 |
| 4 AINEISTO JA MENETELMÄT | 16 |
| 4.1 Koe-eläimet ja ruokinta | 16 |
| 4.2 Biopsiat | 17 |
| 4.3 Glukoosirasituskoe | 18 |
| 4.4 RNA-eristys ja laadun tarkistus | 18 |
| 4.5 cDNA-synteesi | 19 |
| 4.6 Geenit ja alukkeet | 19 |
| 4.7 Kvantitatiivinen PCR | 20 |
| 4.8 Analyysimenetelmät | 23 |
| 4.8.1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ -menetelmä | 23 |
| 4.8.2 Tilastolliset testit | 23 |
| 5 TULOKSET | 25 |
| 5.1 Glukoosirasituskokeen veriarvot | 25 |
| 5.2 Geenitoiminnan erot eri tarkastelutasoilla | 26 |
| 5.2.1 Geenitoiminnan erot koko aineistossa näytteenottoajankohtien välillä | 26 |
| 5.2.2 Geenitoiminnan erot koe- ja kontrolliryhmien välillä eri näytteenottoajankohtina | 27 |
| 5.3 Insuliiniresistenssin arviointi | 29 |
| 5.3.1 Koko aineiston keskimääräisen geenitoiminnan muutos | 29 |
| 5.3.2 Geenitoiminnan muutos ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen | 30 |
| 5.3.3 Geenitoiminnan muutos yksilöittäin | 31 |
| 5.3.4 Ryhmien keskimääräinen geenitoiminnan muutos poikimisen jälkeen | 31 |
| 6 TULOSTEN TARKASTELU | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1 Geenitoiminnan erot eri tarkastelutasoilla | 32 |
| 6.1.1 Geenitoiminnan erot koko aineistolla näytteenottoajankohtien välillä..... | 32 |
| 6.1.2 Geenitoiminnan erot koe- ja kontrolliryhmien välillä eri näytteenottoajankohtina | 32 |
| 6.2 Insuliiniresistenssin arviointi | 34 |
| 6.2.1 Koko aineiston keskimääräisen geenitoiminnan muutos | 34 |
| 6.2.2 Geenitoiminnan muutos ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen | 35 |
| 6.2.3 Geenitoiminnan muutos yksilöittäin poikimisen jälkeen..... | 36 |
| 6.2.4 Ryhmien keskimääräinen geenitoiminnan muutos poikimisen jälkeen | 36 |
| 6.3 Tulosten vertailu muihin tutkimustuloksiin | 36 |
| 6.3.1 Tutkimustuloksia muista tutkimuksista | 36 |
| 6.3.2 Koko aineiston keskimääräisen geenitoiminnan muutos | 38 |
| 6.3.3 Koko aineiston geenitoiminnan muutos aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen | 39 |
| 6.3.4 Kontrolliryhmän geenitoiminnan muutos aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen | 40 |
| 6.3.5 Koeryhmän geenitoiminnan muutos aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen | 40 |
| 7 JOHTOPÄÄTÖKSET | 41 |
| 8 KIITOKSET | 42 |
| LÄHTEET | 43 |
| LIITE1 TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT ALUKKEET..... | 49 |
| LIITE 2 NÄYTTEENOTTOAJANKOHTIEN KESKIMÄÄRÄISET ΔC_T-ARVOT | 50 |

LYHENTEET

| | |
|--------------------------------|--|
| <i>ADIPOQ</i> | Adiponektiini |
| <i>AR1</i> | Adiponektiinireseptori 1 |
| <i>AR2</i> | Adiponektiinireseptori 2 |
| <i>IL6</i> | Interleukiini 6 |
| <i>IRS1</i> | Insuliinireseptorisubstraatti 1 |
| <i>HSL</i> | Hormonisensitiivinen lipaasi |
| <i>LEP</i> | Leptiini |
| <i>LPL</i> | Lipoproteiinilipaasi |
| <i>PCK1</i> | Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi 1 |
| <i>PPARγ</i> | Peroksisomiproliferaattoreilla aktivoituva reseptori gamma |
| <i>RBP4</i> | Retinolia sitova proteiini 4 |
| <i>RES</i> | Resistiini |
| <i>SCD</i> | Stearoyyli-CoA desaturaasi |
| <i>TNFα</i> | Tuumorinekroositekijä alfa |

1 JOHDANTO

Tämä tutkimus on osa laajempaa tutkimushanketta, jossa tutkitaan metabolisen stressin hallintaa poikimisen läheisyydessä. *Metabolisen stressin hallinta poikimisen läheisyydessä – avain lypsylehmän hyvinvointiin* –hanke on Helsingin yliopiston maataloustieteen laitoksen kotieläintieteen sekä kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitoksen tekemä tutkimus, jonka päärahoittajat ovat maa- ja metsätalousministeriö sekä Raisio Oyj:n tutkimussäätiö. Hankkeessa tutkitaan ruokinnan ja metabolisen stressin fysiologisia mekanismeja. Maksan ja ihonalaisen rasvakudoksen geenitoiminnan muutokset ovat metabolisen stressin kannalta keskeisiä. Tutkimuksessa pyritään löytämään mekanismeja, joilla voidaan edistää kotieläinten terveyttä ja kehittää ruokintaa.

Metabolisen stressin on todettu altistavan lehmiä aineenvaihduntasairauksille sekä heikentävän lehmien hedelmällisyyttä sekä yleistä hyvinvointia. Lypsylehmän sopeutuessa maidontuotannon käynnistymiseen sen elimistö vähentää rasvojen varastointia rasvakudokseen ja lisää varastoitujen rasvojen mobilisointia. Maidontuotantokyky lisääntyy rehunsyöntikykyä nopeammin alkulaaktaatiossa, jolloin lehmä paikkaa energiavajettaan kudosasrasvojen mobilisointia lisäämällä (Friggens ym. 2004, Kokkonen ym. 2005). Viimeisen neljänkymmenen vuoden aikana tapahtunut lehmäkohtainen maidontuotannon kaksinkertaistuminen (SVT 2012) altistaa lypsylehmiä enemmän metaboliselle stressille ja aineenvaihduntataudeille. Korkeatuottoisilla lehmillä rasvakudoksen mobilisaation on todettu olevan korkeampi ja insuliiniresistenssin voimakkaampi kuin matalampituottoisilla (Chagas ym. 2009). Myös ummessaolokauden ruokinnan korkea energiapitoisuus on yhdistetty voimakkaampaan metaboliseen stressiin poikimisen jälkeen (Kokkonen ym. 2005, Nielsen ym. 2010). Insuliiniresistenssi voimistuu poikimisen lähestyessä veren insuliinipitoisuuden vähetessä (Kokkonen ym. 2010) ja rasvakudoksen mobilisaation aiheuttaman veren vapaiden rasvahappojen pitoisuuden noustessa (Pires ym. 2007). Insuliiniresistenssissä insuliinin teho on laskenut eivätkä insuliiniin reagoivat kudokset kykene vastaamaan insuliiniin normaalisti (Pittas ym. 2004). Ylipainolla ja ruokinnan energiapitoisuudella on useissa tutkimuksissa todettu olevan yhteyttä insuliiniresistenssiin (Ntambi 1995, Hu ym. 1996, Vozarova ym. 2001).

Energiavaraston lisäksi rasvakudos toimii endokriinisena elimenä säädellen immuunivastetta ja aineenvaihduntaa (Lemor ym. 2009, Mukesh ym. 2010). Tähän tutkimukseen valittiin tutkittavaksi geenejä, jotka ovat lipogeneesiin, lipolyysiin ja insuliinisignalointiin liittyviä geenejä. Geenien tiedetään suoraan tai välillisesti vaikuttavan insuliiniresistenssiin lypsykarjalla, ihmisillä tai laboratorioeläimillä tehtyjen tutkimusten perusteella.

Tutkimuksessa analysoidaan ummessaoloajan energiasaannin vaikutusta metaboliseen stressiin vertaamalla vapaasti ja rajoitetusti ruokittujen lypsylehmien ihonalaisen rasvakudoksen geenitoimintaa ja sen muutoksia poikimisen läheisyydessä. Tuloksia asetettuihin hypoteeseihin, joiden mukaan korkeampi energiasaanti voimistaa metaboliseen stressiin ja insuliiniresistenssiin liittyvää geenitoimintaa.

2 KATSAUS KIRJALLISUUTEEN

2.1 Lipogeneesi, lipolyysi ja insuliiniresistenssi

Lipogeneesi on rasvojen varastointia rasvakudokseen. Varastoitujen rasvojen mobilisointia puolestaan kutsutaan lipolyysiksi. Lypsylehmän alkaessa sopeutua maidontuotannon käynnistymiseen lipogeneesi vähenee ja lipolyysi lisääntyy, jonka seurauksena plasmaan vapautuu vapaita rasvahappoja. Vapaat rasvahapot voidaan varastoida maksaan triglyserideinä, käyttää maitorasvan synteesissä tai hapettaa täydellisesti tai epätäydellisesti, jolloin syntyy ketoaineita. Laktaation alkuvaiheessa lehmän maidontuotantokyky lisääntyy rehunsyöntikykyä nopeammin, jolloin lehmälle syntyy energiavaje. Lehmän elimistö korjaa energiavajetta kudosasrasvojen mobilisointia lisäämällä (Friggens ym. 2004, Kokkonen ym. 2005). Märehtijöillä tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että poikimisen lähestyessä ja maidontuotannon alkaessa rasvakudoksen kyky vastata insuliiniin heikkenee ja lipolyysi sekä rasvakudoksen mobilisaatio lisääntyvät (Pettersson ym. 1994, Vernon ja Pond 1997). Veren vapaiden rasvahappojen pitoisuuden nousu ja rasvan kertyminen kudoksiin johtaa perifeeristen kudosten insuliinin stimuloiman glukoosinoton heikentymiseen ja lipolyysin lisääntymiseen (Pires ym. 2007, Pittas ym. 2004). Tämä johtaa insuliinin tarpeen lisääntymiseen (Pittas ym. 2004), minkä seurauksena perifeeristen kudosten

insuliiniresistenssi voimistuu (Pires ym. 2007). Korkeatuottoisilla lehmillä on todettu tapahtuvan enemmän rasvakudoksen mobilisaatiota sekä niiden insuliiniresistenssi on voimakkaampi kuin vähemmän tuottavilla lehmillä (Chagas ym. 2009). Korkea energian saanti ennen poikimista on yhdistetty voimakkaampaan metaboliseen stressiin poikimisen jälkeen (Kokkonen ym. 2005, Nielsen ym. 2010).

Tähänastisissa tutkimustuloksissa suurin osa rasvakudoksen geenitoiminnan muutoksien tarkastelusta perustuu ihmisillä ja laboratorioeläimillä tehtyihin tutkimuksiin. Ylipainon ja ylimääräisen ruokinnasta saatavan energiamäärän on todettu olevan yhteydessä useiden insuliiniresistenssiin liittyvien geenien toiminnan muutokseen (mm. Ntambi 1995, Hu ym. 1996, Vozarova ym. 2001, Tsuchida ym. 2004). Liiallisen energian saannin on todettu aiheuttavan lisääntyntä rasvahappojen kuljetusta maksa- ja lihassoluihin. Maksa- ja lihassoluissa havaitaan lipidien nettolisäys, mikä aiheutuu rasvahappojen poistuman, solunsisäisen rasvahappojen hapetuksen ja varastoinnin epätasapainosta soluun kuljetettavien rasvahappojen suhteen. Tämä johtaa maksa- ja lihaskudoksen insuliiniresistenssiin (Erion ja Shulman 2010).

2.2 Energiatase

Normaalisti lypsylehmien energiataase on tuotoskauden alkuvaiheessa negatiivinen, mutta vajeen suuruudessa on suuria eroja lehmien välillä sekä geneettisistä että hoidollisista syistä johtuen (Friggens ym. 2004). Kuntoluokituksen avulla on mahdollista seurata lehmien energiataasetta. Kun kudoksiin kertyy rasvaa, lehmän kuntoluokka nousee ja vastaavasti rasvoja mobilisoitaessa kuntoluokka laskee. Kuntoluokituksessa määritetään rasvan määrä luiden ja nahan välissä pisteyttämällä lehmän kunto yhdestä viiteen siten, että kuntoluokka 1 edustaa laihaa ja kuntoluokka 5 lihavaa lehmää. Lehmän poikiessa kuntoluokan suositusarvo on 3,5 (Yli-Hynnilä 1999).

2.3 Rasvakudos ja sen tehtävät

Rasvakudos tunnetaan energiavaraston lisäksi endokriinisena elimenä sen säädellessä immuunivastetta ja aineenvaihduntaa (Lemor ym. 2009, Mukesh ym. 2010). Se tuottaa muun muassa adiposytokiinejä (Ahima & Flier 2000), jotka toimivat auto-, para- ja

endokriinisesti säädellen useita metabolisia tapahtumia (Pittas ym. 2004). Poikimisesta tai patogeenisistä tekijöistä johtuvassa tulehdustilassa rasvakudos voi tuottaa nopeasti adiposytokiinejä. Adiposytokiinien geenitoiminnan lisääntyminen ja rasvakudoksen metabolian muuttuminen vaikuttavat perifeeristen kudosten metaboliaan (Mukesh ym. 2010).

Suurin osa märehitijöillä poikimisen läheisyydessä tehdyistä tutkimuksista keskittyy muutaman geenin tutkimiseen. Sumner ja McNamara (2007) tutkivat lipolyyttisten geenien toiminnan muutosta aikavälillä 30 päivää ennen poikimista ja 270 päivää poikimisen jälkeen ja havaitsivat geenien toiminnan lisääntyvän poikimisen jälkeen. Lemor ym. (2009) puolestaan tutkivat adiposytokiinien ja niiden reseptoreiden geenitoiminnan muutosta rasvakudoksessa aikavälillä viikkoa ennen poikimista ja kolme viikkoa poikimisen jälkeen. Tutkimuksen tulokset viittasivat rasvakudoksen heikentyneeseen adiponektiiniherkkyyteen poikimisen jälkeen, mikä voi liittyä insuliiniherkkyyden heikentymiseen. Sadri ym. (2010) tutkivat tuumorinekroositekijä alfan ja insuliinisignalointiin liittyvien tekijöiden geenitoiminnan muutosta. Tutkimusten tulosten mukaan *TNFα*:n pitoisuuksissa ei havaittu eroja, mutta muutamalla insuliinisignalointiin liittyvällä geenillä havaittiin muutosta geenitoiminnassa, mikä voi liittyä niiden toimintaan insuliiniherkkyyden alenemisessä. Sadri ym. (2011) tutkivat plasman leptiinipitoisuuden muutosta ja sen vaikutusta lipogeneettisten ja lipolyyttisten geenien toimintaan rasvakudoksessa aikavälillä kahdeksan viikkoa ennen poikimista ja viisi viikkoa poikimisen jälkeen. Tutkimuksen tulokset viittasivat lipidisynteesin vähenevän poikimisen jälkeen rasvakudoksessa. Sumner-Thomson ym. (2011) tutkivat 11 lypsylehmän rasvakudoksen geenitoimintaa genomitasolla aikavälillä 30 päivää ennen poikimista ja 14 päivää poikimisen jälkeen. Tutkimuksesta saatujen tulosten mukaan rasvahappojen kuljetukseen osallistuvien geenien ja lipolyysiä säätelevien geenien toiminta lisääntyi ja vastaavasti lipogeneesiin osallistuvien geenien toiminta väheni. Sumner-Thomsonin ym. (2011) mukaan 1080 geenin toiminnan havaittiin lisääntyneen yli 50 %, joista 433 geenin toiminta oli lisääntynyt vähintään kaksinkertaisesti. Geenitoiminnan vähenemistä puoleen havaittiin 337 geenillä (Sumner-Thomson ym. 2011).

2.4 Tutkittavat geenit

2.4.1 *ADIPOQ*

Adiponektiini (*ADIPOQ*) on insuliiniherkkyyttä lisäävä adiposytokiini (Fasshauer ym. 2002). Hiirillä ja rotilla adiponektiinin mRNA:n toiminnan on osoitettu olevan yhteydessä kehon rasvakudoksen määrään. Ylipainoisilla yksilöillä *ADIPOQ*:in geenitoiminta rasvakudoksessa vähenee (Hu ym. 1996) *ADIPOQ*:in geenitoiminta on yhteydessä myös tuumorinekroositekijä alfan (*TNF α*) geenitoimintaan sekä insuliiniherkkyyteen. Tutkimuksissa, joissa tutkittiin ihmisen rasvakudoksen *ADIPOQ*:in geenitoimintaa (Fasshauer ym. 2002) sekä biologisessa 3T3-L1-rasvasolututkimuksessa (Kern ym. 2003) osoitettiin, että *ADIPOQ*:in geenitoiminta rasvakudoksesta on vähäisempää yksilöillä, joilla on korkea *TNF α* -geenitoiminta sekä heikompi insuliiniherkkyys.

2.4.2 *AR1* ja *AR2*

Adiponektiinireseptorien 1 (*AR1*) ja 2 (*AR2*) mRNA:n on todettu vähentyvän rasvakudoksessa poikimisen jälkeen (Lemor ym. 2009) sekä hiirillä tehdyn tutkimuksen mukaan myös liikalihavuudessa (Tsuchida ym. 2004). Tämä johtaa rasvakudoksen adiponektiiniherkkyyden heikentymiseen (Lemor ym. 2009, Tsuchida ym. 2004), mikä voi olla puolestaan yhteydessä heikentyneeseen insuliiniherkkyyteen poikimisen jälkeen. Adiponektiinireseptorit ovat rasvakudoksessa toistensa kanssa positiivisesti korreloituneita (Lemor ym. 2009).

2.4.3 *HSL*

Hormonisensitiivinen lipaasi (*HSL*) aktivoituu energiavarastojen mobilisoinnin alkaessa (Zimmermann ym. 2004). Insuliini alentaa *HSL*:n aktiivisuutta (De Meijer 1998). Sumner ja McNamara (2007) tutkivat lehmien rasvakudoksen lipolyyttisten geenien toimintaa aikavälillä, joka alkoi 30 vuorokautta ennen poikimista ja päättyi 270 vuorokautta poikimisen jälkeen. *HSL*:lla todettiin olevan geenitoimintaa kaikilla

mittausajankohdilla, mutta sen suhteellinen geenitoiminta kuitenkin kasvoi poikimisen jälkeen. Geenitoiminnan muutokset olivat yhteneviä sen lipolyysiä rajoittavan roolin kanssa. Triasyyliglyserolien hydrolysointi käynnistyy *HSL*:n toimesta (Yeaman ym. 1994). *HSL* toimii rajoittavana tekijänä rasvahappojen käsittelyssä, koska sen tehtäviin kuuluu solunsisäisten triglyseridien hydrolysointi adiposyyteissä (Reynisdottir ym. 1997).

2.4.4 *IL6*

Interleukiini 6 (*IL6*) on sytokiini, joka on yhdistetty insuliiniresistenssiin (Pittas ym. 2004). Sen on osoitettu vaikuttavan insuliinisignalointiin heikentäen insuliinin vaikutusta (Bastard ym. 2006). *IL6*:n on osoitettu vähentävän sekä *ADIPOQ*:in (Fasshauer ym. 2002) että *LPL*:n geenitoimintaa (Greenberg ym. 1992). Plasman *IL6*-pitoisuuden on osoitettu korreloivan positiivisesti ylipainon ja insuliiniresistenssin kanssa (Vozarova ym. 2001, Greenberg ym. 1992). Insuliini stimuloi *IL6*:n geenitoimintaa rasvakudoksessa (Krogh-Madsen ym. 2003).

2.4.5 *IRS1*

Ihmisen adiposyyteissä korkean glukoosin ja korkean insuliinin indusoiman insuliiniresistenssin on todettu edeltävän insuliinireseptorisubstraatti 1:n (*IRS1*) proteiinin loppuunkulumista (Renström ym. 2007). 3T3-L1-adiposyyteillä tehdyssä tutkimuksessa *TNFα*:n indusoimaan insuliiniresistenssiin on todettu liittyvän useiden insuliinistimuloituun glukoosikuljetukseen liittyvien komponenttien geenitoiminnan vähenemistä. Näihin komponentteihin sisältyy muun muassa *IRS1* (Stephens ym. 1997). Insuliinireseptorisubstraatit tyrosiinifosforyloituvat normaalisti insuliinireseptorin (*IR*) tyrosiinikinaasin vaikutuksesta kun insuliini kiinnittyy reseptoreihinsa (KEGG 2012). *TNFα* estää *IRS1*:n tyrosiinifosforylaation (KEGG 2011) muuttaen *IRS1*:n toimintaa niin, ettei se enää toimi hyvänä substraattina insuliinireseptorille (Paz ym. 1997). Maksa- ja lihassolujen rasvahappojen nettolisäys liiallisen energiasaannin myötä aiheuttaa solunsisäisen diasyyliglyserolin määrän lisääntymistä (Erion ja Shulman 2010). Erion ja Shulman (2010) esittävät, että tämä todennäköisesti johtaa

proteiinikinaasi C:n (PKC) aktivoitumiseen, jolloin sen isomuodot inhiboivat insuliinin toimintaa maksassa ja lihaksessa ja samalla *IRS1*:n aktiivisuus alenee.

2.4.6 *LEP*

Leptiini (*LEP*) tuotetaan pääosin rasvakudoksessa ja se säätelee ruokahalua ja energiatehokkuutta. *LEP* säätelee sekä rasvan määrää kehossa että se myös auttaa adaptoitumaan aliravitsemukseen (Chilliard ym. 2001). Aliravitsemus vähentää *LEP*:n määrää (Bornstein ym. 1997). Syöminen stimuloi insuliinin eritystä, joka puolestaan stimuloi leptiinin eritystä. Pitkällä aikavälillä ruumiin rasvaprosentin kasvu lisää *LEP*:n synteesiä. Lyhyellä aikavälillä *LEP*:n säätelyyn liittyy useita vuorovaikutuksia eri komponenttien, kuten insuliinin ja vapaiden rasvahappojen kesken (Chilliard ym. 2001). Wang ym. (2001) tutkivat rottien lyhytaikaisen energian tarpeen ylittävän ruokinnan vaikutusta ja havaitsivat sen johtavan leptiiniresistenssiin.

2.4.7 *LPL*

Lipoproteiini lipaasi (*LPL*) on geeni, jonka entsyymit vaikuttavat lipidisynteesiin (Vernon ja Pond 1997). Se on yksi tärkeistä rajoittavista tekijöistä rasvahappojen käsittelyssä ja sen tehtävänä on hydrolysoida solun ulkopuolisia triglyseridejä lipoproteiineista (Reynisdottir ym. 1997). Lipoproteiinien hajottaminen vapauttaa rasvaa, jota keho voi käyttää energiaksi tai varastoida. Insuliiniresistenssissä lipogeneettisten geenien geenitoiminta alentuu (Vernon ja Pond 1997). Ihmisillä tehdyssä tutkimuksessa on todettu, että insuliiniresistenssiä sairastavilla miespotilailla ihonalaisen rasvakudoksen *LPL*:n entsyymiaktiiviteetti oli 43 % matalampi kuin terveillä (Reynisdottir ym. 1997). Sekä jyrksijöillä että märehitijöillä on havaittu *LPL*:n geenitoiminnan alentumista laktation aikana samanaikaisesti adiposyyttien muuttuessa resistenteiksi insuliinille (Vernon ja Pond 1997).

2.4.8 *PCK1*

Fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi 1 (*PCK1*) säätelee glukoneogeneesiä. *PCK1* vaikuttaa maksan ja rasvakudoksen välillä tapahtuvaan triglyseridien kuljetukseen sekä

osallistuu lipogeneesiin (Millward ym. 2010). Naudalla tehdyssä tutkimuksessa on saatu todisteita *PCK*:n geenitoiminnan lisääntymisestä rasvakudoksessa tiineyden aikana, kun nauta on ollut korkeaenergisellä ruokinnalla (Loor 2010). *ADIPOQ*:lla ja *PCK*:lla on keskenään negatiivinen korrelaatio. *ADIPOQ* indusoi AMPK-aktivaatiota, joka johtaa tapahtumavaiheiden kautta *PCK*:n inhibointiin (KEGG 2011). Insuliiniresistenssissä *ADIPOQ*:n geenitoiminta kuitenkin laskee, joka voi johtaa *PCK*:n geenitoiminnan lisääntymiseen.

2.4.9 *PPAR* γ

Peroksisomiproliferaattoreilla aktivoituva reseptori gamma (*PPAR* γ) säätelee useita insuliiniresistenssiin vaikuttavia geenejä (Millward ym. 2010). *PPAR* γ :n rooli on säädellä insuliinisignalointiin liittyvien molekyylien ja proteiinien toimintatasoa siten, että kudosten insuliiniherkkyys pysyy normaalina (Olefsky ja Saltier 2000). *PPAR* γ :n geenitoiminnan on todettu vähenevän ihmispotilailla, jotka kärsivät tyypin 2 diabeteksesta (Hoeks ym. 2006). Tutkimukset ovat osoittaneet, että insuliiniresistenssi on keskeisessä asemassa tyypin 2 diabeteksen kehittymiseen (Olefsky ja Saltier 2000, Hoeks ym. 2006).

2.4.10 *RBP4*

Retinolia sitova proteiini 4 (*RBP4*) kuljettaa retinolia. Sitä tuotetaan muun muassa rasvakudoksessa ja maksassa (Yang ym. 2005). Ihmistutkimuksissa on todettu, että seerumin *RBP4*-pitoisuus korreloi insuliiniresistenssin voimakkuuden kanssa (Graham ym. 2006). Insuliiniresistenteillä hiirillä on seerumissa osoitettu olevan kohonnut *RBP4*-pitoisuus samoin kuin ylipainoisilla, tyypin 2 diabeteksesta kärsivillä ihmisillä (Yang ym. 2005).

2.4.11 *RES*

Resistiini (*RES*) on yhdistetty insuliiniresistenssin kehittymiseen (Pittas ym. 2004) ja se osallistuu adiposyyttien erilaistumisen säätelyyn (Arner 2003). Jyrsijöillä tehty tutkimus osoittaa, että verenkierron ja rasvakudoksen *RES*-pitoisuudet nousevat lihavilla

yksilöillä (Bastard ym. 2006). Adiposyytit tuottavat *RES*:iä jonka pitoisuuden on osoitettu nousevan sekä ruokinnan indusoimassa että geneettisessä ylipainossa (Steppan ym. 2001). *RES* voi toimia rasvakudoksessa linkkinä ylipainon ja insuliiniresistenssin välillä (Bastard ym. 2006). Komatsu ym. (2003) tutkimuksessa havaittiin, että naudalla resistiinin geenitoiminta rasvakudoksessa lisääntyy laktaation alkaessa.

2.4.12 *SCD*

Stearoyyli-CoA desaturaasi (*SCD*) on lipogeneesiin vaikuttava geeni, jonka tuottama entsyymi katalysoi monityydyttymättömien rasvahappojen synteesiä (Ntambi ym. 2002). *SCD*:n geenitoiminta on herkkä ruokinnan energiatason muutosten vaikutuksille ja muun muassa ylipainoisilla yksilöillä sen aktiviteetin on havaittu olevan korkea (Ntambi 1995). Ntambi ym. (2002) tutkivat hiirien *SCD*:n geenitoimintaa, ja he totesivat *SCD*:llä olevan tärkeä rooli kehon rasvan muodostumisessa.

2.4.13 *TNF α*

Rasvakudos syntetisoi muiden sytokiinien ohella tuumorinekroositekijä alfaa (*TNF α*) (Arner 2003). *TNF α* säätelee rasvojen metaboliaa ja sillä on tärkeä rooli useassa insuliinivälitteisessä prosessissa (Sethi ja Hotamisligil 1999). *TNF α* ja *ADIPOQ* toimivat toisilleen vastavoimina. *TNF α* estää *IRS1*:n tyrosiinifosforylaation ja indusoi täten insuliiniresistenssiä (Hotamisligil ym. 1996). Ylipainoisilla *TNF α* :n pitoisuuden on todettu lisääntyvän rasvakudoksessa (Bastard ym. 2006). *TNF α* myös inhiboi *LPL*:n aktiviteettia (Kern ym. 1995). Rasvakudoksen *TNF α* :n geenitoiminnan voimakkuus korreloi muun muassa kehon rasvaprosentin ja hyperinsulinemian kanssa (Kern ym. 1995).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena on analysoida geenitoiminnan muutosten avulla ummessaoloajan energian saannin merkitystä metabolisen stressin ja insuliiniresistenssin voimakkuuteen. Tutkimuksessa verrataan vapaasti ja rajoitetusti

ruokittujen lypsylehmien ihonalaisen rasvakudoksen geenitoimintaa näytteenottoajankohdilla kahdeksan päivää ennen poikimista sekä päivä ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen. Tavoitteena on pyrkiä määrittämään ummessaolokauden energiansaannin eri tasojen vaikutusta lypsylehmien rasvakudoksen energia-aineenvaihduntaan liittyvien geenien toimintaan. Havaittuja geenitoiminnan muutoksia verrataan asetettuihin hypoteeseihin, joiden mukaan korkeampi energian saanti ennen poikimista voimistaa metabolista stressiä. Tutkimustulosten perusteella kehitetään ummessaoloajan ruokintaa edistämään lypsylehmien poikimisen aikaista terveyttä.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Koe-eläimet ja ruokinta

Tutkimuksessa käytettiin Helsingin yliopiston tutkimus- ja opetustilan navetan lehmii. Tutkimuksessa oli mukana 16 vähintään kerran poikinutta ayrshirelehmää. Koe toteutettiin vuosina 2009 ja 2010. Koe aloitettiin kuusi viikkoa ennen oletettua poikimispäivää ja lopetettiin, kun poikimisesta oli kulunut kahdeksan viikkoa. Lehmät pidettiin parressa koko ummessaolokauden ja kahden ensimmäisen poikimisen jälkeisen viikon ajan, jonka jälkeen ne siirrettiin pihattoon.

Kokeessa käytettiin kahta kahdeksan lehmän ryhmää, joista toinen toimi kontrolliryhmänä ja toinen koeryhmänä. Kokeen aikana kaksi lehmää, yksi kontrolli- ja yksi koeryhmästä, jouduttiin poistamaan aineistosta poikimisen jälkeen. Koe tehtiin täydellisesti satunnaistettuna lohkokokeena. Lehmät jaettiin pareihin oletetun poikimapäivän sekä poikimakerran perusteella. Kustakin parista arvottiin lehmät koe- ja kontrolliryhmiin. Ennen kokeen alkamista ryhmien välillä ei ollut eroa kuntoluokissa tai painoissa (Taulukko 1) ja eläimet oletettiin lähtökohtaisesti terveiksi. Kokeen alussa, viikoilla 6, 5 ja 4 ennen oletettua poikimispäivää, kontrolliryhmää ruokittiin rajoitetusti ja koeryhmää vapaasti. Vapaan säilörehuruokinnan ryhmässä energian saanti oli noin 1,5-kertainen lehmien laskennalliseen energiatarpeeseen nähden. Energiatarve laskettiin suomalaisten ruokintasuositusten mukaan (MTT 2012). Kontrolliryhmää ruokittiin koko ummessaolokauden päivittäisen laskennallisen energian tarpeen mukaisesti. Koeryhmän lehmien syömän säilörehun määrä viikoilla 6, 5 ja 4 ennen oletettua poikimista oli 42 %

suurempi kuin kontrolliryhmän lehmillä (Taulukko 1, $p < 0,001$). Koeryhmän lehmille annettavan säilörehun määrää alettiin rajoittaa viikoilla 3 ja 2 ennen oletettua poikimista. Rehusta saatavan energian määrää vähennettiin asteittain, mutta laskennallisesti koeryhmän lehmät saivat noin 25 % kontrolliryhmän lehmiä enemmän energiaa näiden kolmen viikon aikana. Koeryhmän lehmien säilörehun määrän rajoituksen myötä koe- ja kontrolliryhmien lehmien säilörehuannos sekä laskennallinen energiansaanti olivat samalla tasolla oletettuun poikimispäivään mennessä. Molemmat ryhmät ruokittiin samalla tunnusruokinnalla, millä lehmät saivat 30 % energiansaannistaan väkirehusta ja 70 % säilörehusta. Ummessaolokauden aikana lehmillä tapahtunut elopainon nousu oli koeryhmän lehmillä keskimäärin 13 kg kontrolliryhmän lehmien elopainon nousua suurempi. Poikimisen jälkeen molempien ryhmien ruokinta oli samanlainen. Ryhmät saivat saman verran väkirehua ja säilörehu annettiin vapaasti. Kummankin ryhmän väkirehumäärä nostettiin 16 kiloon 32 päivän aikana. Elopainossa, kuntoluokassa ja syönnissä ei havaittu eroa ryhmien välillä poikimisen jälkeen (Taulukko 1).

Taulukko 1. Ryhmien elopainot, kuntoluokat ja syönti (Kokkonen 2012, julkaisematon)

| | Kontrolliryhmä | Koeryhmä | SE | Merkitsevyys |
|---|----------------|----------|-------|--------------|
| Elopaino (kg) ennen poikimista | 707 | 718 | 21,3 | 0,67 |
| Elopaino (kg) poikimisen jälkeen | 644 | 665 | 19,1 | 0,41 |
| Kuntoluokka ennen poikimista | 3,76 | 3,67 | 0,112 | 0,58 |
| Kuntoluokka poikimisen jälkeen | 3,14 | 3,17 | 0,124 | 0,89 |
| Syönti (kg ka/pv) viikoilla 6-4 ennen poikimista | 8,88 | 12,64 | 0,298 | <0,0001 |
| Syönti (kg ka/pv) poikimisen jälkeen | 9,73 | 10,18 | 0,525 | 0,39 |

4.2 Biopsiat

Geenitoiminnan tutkimusta varten lehmiltä otettiin biopsiat ihonalaisesta rasvakudoksesta. Biopsiat kerättiin kahdeksan päivää ennen oletettua poikimispäivää sekä yksi ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen hännäntyven rasvakudoksesta. Ihoon tehtiin ohut viilto ja rasvakudosnäyte leikattiin irti paikallispuudutuksessa ja rauhoituksessa. Rasvakudosnäytteet siirrettiin kryoputkiin, merkattiin ja jäädytettiin

välittömästi nestetypen avulla. Rasvanäytteet säilöttiin myöhempää analysointia varten pakastimeen, jonka lämpötila oli -80°C .

4.3 Glukoosirasituskoe

Lehmille tehtiin glukoosirasituskokeet seitsemän päivää ennen oletettua poikimista ja kymmenen päivää poikimisen jälkeen. Glukoosirasituskoe antaa suoran mittaustuloksen solujen insuliinivälitteisestä glukoosin käytöstä. Kokeessa lehmille annettiin 0,25g glukoosia elopainokiloa kohti kaulalaskimokatetrasta. Ennen kokeen aloittamista lehmistä otettiin kontrolliverinäyte. Glukoosin annon jälkeen lehmiltä otettiin 12 verinäytettä kolmen tunnin aikana. Glukoosirasituskokeissa määritettiin lehmien veren insuliinipitoisuus, vapaiden rasvahappojen pitoisuus sekä glukoosipitoisuus.

4.4 RNA-eristys ja laadun tarkistus

Kudosnäytteitä kerättiin yhteensä 46 kappaletta ja näytteet pidettiin koko ajan nestetypessä tai -80°C pakastimessa. Kerätyistä kudospaloista eristettiin kokonais-RNA. Kokonais-RNA:n eristys tehtiin RNeasy Lipid Tissue Mini tuotepaketin (Qiagen GmbH, Hilden, Saksa) ohjeiden mukaisesti. Näytepaloista leikattiin pala, joka homogenisoitiin TissueRupter-homogenisaattorilla (Qiagen GmbH, Hilden, Saksa) QIAzol-lyysausliuoksessa. RNA:n puhdistusvaiheiden jälkeen RNeasy-puhdistuspylväs siirrettiin puhtaaseen 2 ml keräysputkeen ja sentrifugoitiin täydellä nopeudella minuutin ajan. Puhdistuspylvästä RNA eluoiitiin 50 μl :n tilavuuteen. Yhden näytteen kohdalla lopullisen RNA:n eluointi tehtiin kahdessa erässä johtuen kudospalan pienuudesta ja sen huonosta hajoamisesta homogenisoinnissa. Valmiit RNA-eristeet säilöttiin pakastimeen, jonka lämpötila oli -80°C .

Saadun kokonais-RNA:n laatu arvioitiin elektroforeesilla. Tähän käytettiin Agilent RNA 6000 Nano tuotepakettia ja Agilent 2100 -laitetta ja laadunarviointi tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Lisäksi kokonais-RNA:n määrät kvantitoitiin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Kokonais-RNA:n laadun kriteereinä pidettiin

NanoDrop 1000 –laitteen antamia tuloksia kokonais-RNA:n konsentraatiosta (ng/μl) ja absorbanssisuhdetta (260/280) sekä Agilent 2100-laitteen antamia tuloksia kokonais-RNA:n RIN-arvosta (engl. RNA integrity number). Absorbanssisuhde lasketaan 260 nm ja 280 nm aallonpituuksilla mitatuista absorbanseista ja se kertoo RNA:n puhtaudesta. RIN-arvo kertoo RNA:n eheydestä (Schroeder ym. 2006). Ensimmäisenä kriteerinä uusittaville kokonais-RNA-eristyksille käytettiin RIN-arvoa. Uusittaviksi valittiin kudospalat, joilla ei ollut RIN-arvoa lainkaan tai se oli alle 2. Toistetut kokonais-RNA-eristykset analysoitiin Agilent 2100 –laitteella.

4.5 cDNA-synteesi

Kokonais-RNA:sta syntetisoitiin cDNA:ta käyttäen Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis tuotepaketin menetelmiä A ja B (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). RNA:iden suhteellisen laimeuden vuoksi RNA-alukeseosta valmistettaessa ei liuokseen lisätty lainkaan vettä, vaan 12 μl totaali-RNA:ta ja 1 μl oligo(dT)₁₈- tai heksameerialuketta. RNA-alukeseos denaturoitiin lämmittämällä putkia 10 minuuttia 65°C:ssa. cDNA:iden tilavuudeksi saatiin 20 μl/näyte. RNA-aluke-Master Mix –seos sekoitettiin, sentrifugoitiin ja inkuboitiin 30 minuuttia 55°C:ssa sekä inaktivoitiin käänteistranskriptaasi lämmittämällä seosta 85°C:ssa viisi minuuttia. Reaktio pysäytettiin laittamalla putket jäähauteeseen ja varastoimalla ne -20°C pakastimeen.

4.6 Geenit ja alukkeet

Tutkimuksessa tarkasteltiin yhteensä 14 geenin toimintaa. Rasvakudoksen energiametaboliaan vaikuttavat geenit valittiin kirjallisuuden perusteella. Kullekin geenille suunniteltiin alukkeet tai käytettiin kirjallisuudesta löydettyjä, vastaavanlaisissa tutkimuksissa käytettyjä alukkeita (LIITE 1). Alukeparien suunnitteluun käytettiin Primer3-ohjelmaa (Rozen & Skaletsky 2000). Alukeparit suunniteltiin yhteensä yhdeksälle geenille ja kirjallisuudesta löydettyjä alukkeita käytettiin viidelle geenille. Primer3-ohjelmalla suunniteltiin alukkeet adiponektiinille (*ADIPOQ*), interleukiini-6:lle (*IL-6*), insuliinireseptorisubstraatti 1:lle (*IRS1*), leptiinille (*LEP*),

fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi 1:lle (*PCK1*), peroksisomiproliferaattoreilla aktivoituvalla reseptorilla γ (PPAR γ), retinolia sitovalle proteiini 4:lle (*RBP4*), resistiinille (*RES*) sekä tuumorinekroositekijä-alfalle (*TNF α*). Kirjallisuudesta löydettyjä alukkeita käytettiin geeneille adiponektiinireseptori 1 (*AR1*) (Lemor ym. 2009), adiponektiinireseptori 2 (*AR2*) (Lemor ym. 2009), hormonisensitiivinen lipaasi (*HSL*) (Sumner ja McNamara 2007), lipoproteiinilipaasi (*LPL*) (Bionaz ja Loor 2008) sekä stearoyyli-CoA-desaturaasi (*SCD*) (Bionaz ja Loor 2008). Kontrolligeeninä tutkimuksessa käytettiin eukaryoottien translaation aloitustekijä 3, alayksikkö K (*EIF₃K*) –geeniä. Tärkeimpinä kriteereinä alukkeiden valintaan pidettiin niiden samaa sulamislämpötilaa (noin 65°C) ja niiden rajaaman PCR-tuotteen pituutta (alle 200 bp).

4.7 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiiviset PCR:t tehtiin Helsingin yliopiston DNA-sekvensoinnin ja genomiikan laboratoriossa käyttäen Roche Light Cycler 480 –laitetta (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa). PCR-seokset tehtiin Light Cycler 480 SYBR Green I Masterin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa) tuotepaketin mukaisesti. Kvantitatiivinen PCR pipetoitiin Eppendorfin epMotion 5075 –pipetointirobotilla (Eppendorf AG, Hampuri, Saksa) 384 –levyille.

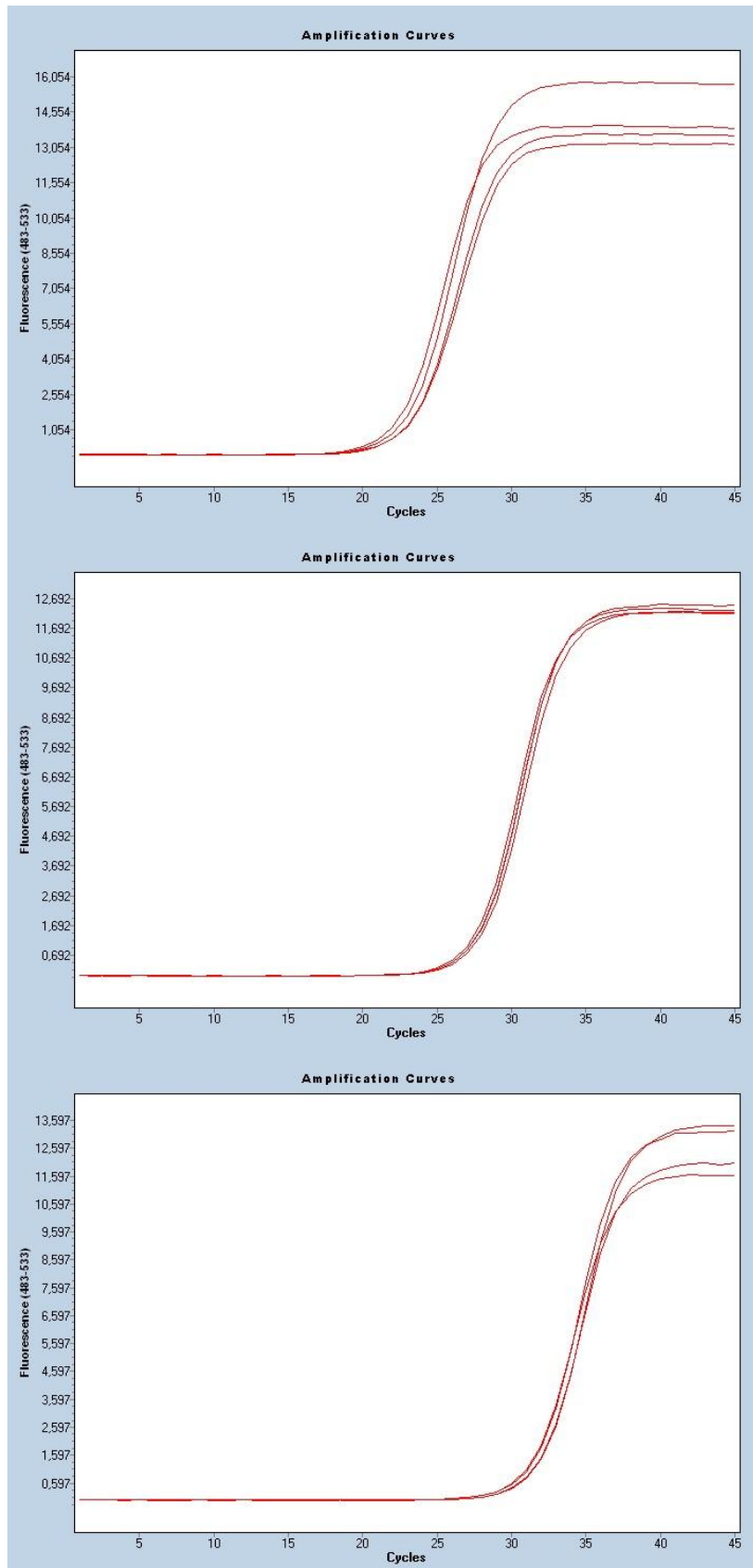
Ennen tutkittavien näytteiden kvantitatiivisen PCR:n aloittamista tehtiin testejä optimaalisten laimennusten löytämiseksi. Kvantitatiivisen PCR:n reaktiivilavuus oli 10 μ l, josta 2,5 μ l oli cDNA-laimennosta ja 7,5 μ l Master Mix-alukeseosta. *AR1*, *AR2*, *HSL*, *LPL* ja *SCD* testattiin ensin käyttäen alukekonsentraationa 0,5 pmol/ μ l ja cDNA-laimennoksia 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32. Tästä testauksesta *AR1* ja *HSL* antoivat huonoja tuloksia, joten nämä kaksi testattiin uudelleen. Kontrollina käytetyn *EIF₃K*:n alukekonsentraationa oli 0,5 pmol/ μ l ja testattavien alukkeiden *AR1* ja *HSL* sekä 0,25 pmol/ μ l että 1 pmol/ μ l ja cDNA-laimennoksina käytettiin 1:8 ja 1:16. Monistumisen alkamiseen tarvittavien syklien lukumäärän, saturaatiotason ja fluoresenssin voimakkuuden perusteella alukkeille valittiin optimaaliset olosuhteet.

Tutkittavat näytteet jaettiin kolmelle 384-levylle yksilöittäin kunkin yksilön näytteiden kokonais-RNA:n konsentraatioiden keskiarvojen perusteella. Jaettaessa yksilöittäin kaikki näytteet samalle levylle voitiin yksilöittäin poistaa mahdollinen levyvaikutus eri

levyjen välillä. Yhden levyn kokonais-RNA:iden konsentraatioiden keskiarvo ylitti 100 ng/μl ja yhden levyn konsentraatioiden keskiarvo oli noin 100 ng/μl. Näille levyille käytettiin cDNA:n laimennussuhteena 1:16 ja alukekonsentraationa 0,25 pmol/μl. Levyille, jonka kokonais-RNA:iden konsentraatioiden keskiarvo oli alle 100 ng/μl, käytettiin cDNA:n laimennussuhteena 1:8 ja alukekonsentraationa 0,5 pmol/μl.

PCR-ajon alkudenaturaatio kesti 5 minuuttia ja lämpötila oli 95°C. Monistumissykli toistettiin 45 kertaa. Denaturaatiolämpötila oli 95°C ja sen kesto oli 20 sekuntia, alukkeiden kiinnittymisen lämpötila oli 60°C ja sen kesto oli 20 sekuntia ja DNA-juosteen pidentymisen lämpötila oli 72°C ja sen kesto oli 20 sekuntia. Lopuksi suoritettiin jäähdytys 40°C lämpötilassa 30 sekunnin ajan. PCR-ajoista saatiin kullekin yksilölle kunkin ajankohdan geenien kuvaajat, joista havaittiin tuotteen monistuminen, saturaatio ja fluoresenssi (Kuva 1).

Kuuden näytteen kvantitatiivinen PCR toistettiin kaikilla tutkittavilla geeneillä ja neljän näytteen kvantitatiivinen PCR toistettiin kontrolligeenin ja *HSL*:n osalta. Uusittavilta näytteiltä ei ollut havaittavissa saturaatiota tai fluoresenssi oli liian matala. Toistettaessa kvantitatiivista PCR:ää käytettiin samoja cDNA-laimennoksia kuin aiemmin ja alukekonsentraationa käytettiin 0,25 pmol/μl lukuun ottamatta kontrolligeeniä, jolle alukekonsentraationa käytettiin 0,5 pmol/μl.



Kuva 1. Lehmän 483 kvantitatiivisen PCR:n *SCD*-kuvaajat kahdeksan päivää ennen poikimista, päivä poikimisen jälkeen ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen.

4.8 Analyysimenetelmät

4.8.1 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmä

Kvantitatiivisen PCR:n tulokset analysoitiin käyttämällä $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmää, jonka avulla voidaan laskea suhteellisia muutoksia geenitoiminnassa (Livak ja Schmittgen 2001). ΔC_T -arvo kuvaa tutkittavan geenin ja kontrolligeenin kynnysykylien keskiarvojen välistä erotusta. Negatiivinen ΔC_T -arvo kuvaa tutkittavan geenin suurempaa toimintaa kontrolligeeniin verrattuna ja positiivinen arvo vähäisempää toimintaa. ΔC_T -arvon suureneminen kuvastaa geenitoiminnan vähenemistä ja puolestaan ΔC_T -arvon pieneneminen geenitoiminnan lisääntymistä. $\Delta\Delta C_T$ -arvo saadaan, kun ΔC_T -arvot standardoidaan tiettyyn vertailunäytteen arvoon. Esimerkiksi vertailtaessa koe- ja kontrollikäsittelyjen vaikutusta geenitoimintaan voidaan sopia, että kontrollikäsittelyn $\Delta\Delta C_T$ -arvoihin verrataan koekäsittelyn $\Delta\Delta C_T$ -arvoja. PCR-tuotteille, jotka ovat alle 150 emäsparin pituisia ja joiden Mg^{2+} - ja alukekonsentraatiot ovat optimoidut, tutkittavan geenin määrä voidaan laskea $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmällä (Livak ja Schmittgen 2001). Amplifikaation tehokkuus sekä kontrolli- että tutkittavalla geenillä täytyy olla lähes samanlainen, jotta $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmää voidaan käyttää (Livak ja Schmittgen 2001). Geenitoiminnan prosentuaalisia muutoksia laskettiin $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmän avulla ja ΔC_T -arvojen avulla analysoitiin aineiston normaalijakautuneisuutta sekä ryhmien ja yksilöiden geenitoiminnan muutoksen suuntia ja eroavaisuuksia.

4.8.2 Tilastolliset testit

Tilastolliset testit tehtiin käyttäen ΔC_T -arvoja. ΔC_T -arvot muunnettiin laskemalla niiden neliöjuuret ja logaritmit. Useilla geneilla ΔC_T -arvot olivat negatiivisia, joten logaritmien ja neliöjuurien laskemiseksi negatiivisten ΔC_T -arvojen omaaviin geeniryhmiin ΔC_T -arvoon lisättiin luku 10 tai 12 positiivisten arvojen ja sitä kautta lukujen verrattavuuden saavuttamiseksi. Geenit, joiden ΔC_T -arvoon lisättiin 10, olivat *ADIPOQ*, *AR1*, *AR2*, *HSL*, *LEP*, *PCK1*, *PPAR γ* sekä *RES*. Geenit, joiden ΔC_T -arvoon lisättiin 12, olivat *RBP4*, *SCD* ja *LPL*. Aineistojen normaalijakautuneisuus testattiin R-tilastopakettin (<http://www.r-project.org/>) Shapiro-Wilkin testillä (Shapiro ja Wilk

1965). Aineisto ei ollut kaikkien geenien osalta normaalisti jakautunut (Taulukko 2), joten geenitoiminnan analysointiin käytettiin ei-parametrisiä arvoja. Myös muut tilastolliset testit tehtiin R-tilastopakettien ohjelmilla.

Taulukko 2. Tutkittavien geenien normaalijakautuneisuuden testaus Shapiro-Wilkin testillä

| Geeni | p(Δ Ct) | p(LOG Δ Ct) | p(SQRT Δ Ct) |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>ADIPOQ</i> | $4,278 \times 10^{-8}$ | 0,001 | $6,308 \times 10^{-6}$ |
| <i>ARI</i> | 0,045 | 0,017 | 0,031 |
| <i>AR2</i> | 0,300* | 0,035 | 0,268* |
| <i>HSL</i> | 0,465* | 0,167** | 0,436* |
| <i>IL6</i> | 0,686* | $9,785 \times 10^{-6}$ | 0,090* |
| <i>IRS1</i> | $7,537 \times 10^{-5}$ | $1,143 \times 10^{-7}$ | $2,885 \times 10^{-6}$ |
| <i>LEP</i> | 0,002 | 0,699** | 0,084* |
| <i>LPL</i> | 0,816* | 0,023 | 0,753** |
| <i>PCK1</i> | 0,282* | 0,341** | 0,754* |
| <i>PPARγ</i> | 0,001 | $6,455 \times 10^{-7}$ | 0,0001 |
| <i>RBP4</i> | 0,197* | $2,233 \times 10^{-7}$ | 0,001 |
| <i>RES</i> | 0,008 | $3,373 \times 10^{-5}$ | 0,001 |
| <i>SCD</i> | 0,355* | 0,002 | 0,510* |
| <i>TNFα</i> | 0,085* | 0,280** | 0,240* |

* normaalisti jakautunut

** lineaarinen ja normaalisti jakautunut

Tutkimuksessa analysoitiin geenitoiminnan muutoksia eri aikapisteiden välillä sekä koko aineistoa käyttäen että verraten yksilöitä tai ryhmiä toisiinsa. Kruskal-Wallisjärjestyssummatestillä vertailtiin kontrolli- ja koeryhmien välisiä eroja geenitoiminnassa eri näytteenottoajankohdilla. Kruskal-Wallis testillä testattiin myös kolmen näytteenottoajankohdan välisiä geenitoiminnan eroja koko aineistolla. Merkkitestin avulla tarkasteltiin, kuinka kunkin yksilön geenitoiminta kullakin geenillä oli muuttunut eri aikapisteiden välillä. Yksilöiden tulokset yhdistämällä tarkasteltiin kokonaisuudessaan kaikkien yksilöiden geenitoiminnan muutoksen suuntaa sekä verrattiin kontrolli- ja koeryhmien geenitoiminnan muutoksia keskenään. Tutkimukseen valituille 14 geenille kerättiin kirjallisuudesta taustatietoa, joiden perusteella asetettiin kunkin geenin geenitoiminnan muutokselle suunnat insuliiniresistenssissä. Merkkitestillä analysoitiin yksilöiden mahdollinen geenitoiminnan muutos,

geenitoiminnan muutoksen suunta sekä toteutuiko kontrolli- ja koeryhmän geenitoiminnan välinen ero asetettujen hypoteesien mukaisesti.

5 TULOKSET

5.1 Glukoosirasituskokeen veriarvot

Tutkittaville lehmille tehtiin glukoosirasituskokeet seitsemän päivää ennen oletettua poikimista ja kymmenen päivää poikimisen jälkeen. Glukoosirasituskokeessa määritettiin veren vapaiden rasvahappojen määrä, glukoosipitoisuus sekä insuliinipitoisuus. Kokeen perusteella havaittiin, että koeryhmän lehmillä veren insuliinipitoisuus ennen poikimista oli suurempi ($P=0,09$) ja vapaiden rasvahappojen pitoisuus pienempi ($P=0,03$) kuin kontrolliryhmällä (Taulukko 3). Glukoosipitoisuuksissa ei ryhmien välillä havaittu merkitsevää eroa kumpanakaan näytteenottoajankohtana, eikä veren insuliini- tai vapaiden rasvahappojen pitoisuuksissa poikimisen jälkeen.

Taulukko 3. Glukoosirasituskokeen veriarvot (Kokkonen 2012, julkaisematon)

| | | Kontrolliryhmä | Koeryhmä | SE | Merkitsevyys |
|-------------------|-----------------------------------|----------------|----------|------|--------------|
| Glukoosi | Ennen poikimista (mmol/l) | 4,43 | 4,29 | 0,09 | 0,24 |
| | Poikimisen jälkeen (mmol/l) | 3,40 | 3,32 | 0,13 | 0,51 |
| Vapaat rasvahapot | Ennen poikimista (mmol/l) | 0,24 | 0,18 | 0,02 | 0,03 |
| | Poikimisen jälkeen (mmol/l) | 0,49 | 0,46 | 0,05 | 0,64 |
| Insuliini | Ennen poikimista (μ IU/ml) | 15,90 | 24,20 | 3,41 | 0,09 |
| | Poikimisen jälkeen (μ IU/ml) | 8,60 | 11,10 | 2,70 | 0,52 |

5.2 Geenitoiminnan erot eri tarkastelutasoilla

5.2.1 Geenitoiminnan erot koko aineistossa näytteenottoajankohtien välillä

Aineistoa tarkasteltiin sekä koko aineistoa käyttäen että erottaen koe- ja kontrolliryhmät ja näytteenottopäivät. Tarkasteltaessa koko aineistoa tutkittiin lehmien rasvakudoksen geenitoiminnan eroja kolmen näytteenottopäivän välillä Kruskal-Wallisjärjestyssummatestillä. Analysoinnissa olivat mukana yksilöt, joilta oli tulos jokaiselta kolmelta näytteenottoajankohdalta. Kultakin näytteenottopäivältä laskettiin geeneittäin ΔC_T -arvojen keskiarvot (LIITE 2) ja näitä verrattiin keskenään. Eroja rasvakudoksen geenitoiminnassa havaittiin seitsemällä geenillä, jotka olivat *ADIPOQ*, *LEP*, *RES*, *SCD*, *PCK1*, *PPAR γ* ja *RBP4* (Taulukko 4). Näistä geeneistä erityisesti *LEP*- ja *SCD*-geenien toiminnan muutos näkyi tilastollisesti merkitsevästi ($P(\textit{LEP})=0,001$ ja $P(\textit{SCD})=0,004$). Laskettaessa näiden geenien poikimisen jälkeisen ajan $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -arvojen keskiarvot ja vertailemalla niitä $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -arvoihin ennen poikimista havaittiin, että *LEP*-geenin toiminta oli poikimisen jälkeen keskimäärin 49 % ja *SCD*-geenin toiminta keskimäärin 69 % toiminnan määrästä ennen poikimista.

Taulukko 4. Geenitoiminnassa havaittavat erot kolmen näytteenottoajankohdan välillä

| Geeni | Riskitaso (P) | Testisuure (χ^2) |
|--------------------------------|---------------|-------------------------|
| <i>ADIPOQ</i> | 0,021* | 0,681 |
| <i>AR1</i> | 0,777 | 0,505 |
| <i>AR2</i> | 0,245 | 2,814 |
| <i>HSL</i> | 0,692 | 0,736 |
| <i>IL6</i> | 0,876 | 0,265 |
| <i>IRS1</i> | 0,118 | 4,281 |
| <i>LEP</i> | 0,001*** | 13,510 |
| <i>LPL</i> | 0,147 | 3,831 |
| <i>PCK1</i> | 0,011* | 8,998 |
| <i>PPARγ</i> | 0,018* | 8,000 |
| <i>RBP4</i> | 0,041* | 6,397 |
| <i>RES</i> | 0,026* | 7,308 |
| <i>SCD</i> | 0,0004 *** | 15,509 |
| <i>TNFα</i> | 0,678 | 0,777 |

***($P<0,001$), **($P<0,01$), *($P<0,05$) ja o($P<0,10$)

5.2.2 Geenitoiminnan erot koe- ja kontrolliryhmien välillä eri näytteenottoajankohtina

Geenitoiminnan eroja koe- ja kontrolliryhmien välillä kolmena näytteenottoajankohtana analysoitiin Kruskal-Wallis testillä. Testaukseen käytettiin yksilöitä, joilla oli kaikkien kolmen näytteenottoajankohdan tulokset. Kullakin ajankohdalla vähintään yksi geeni osoitti eroa toiminnassa ryhmien välillä joko tilastollisesti merkitsevästi tai suuntaa-antavasti (Taulukko 5). Tilastollisesti merkitsevin ero oli *IRSI*-geenin toiminnassa ($P=0,021$) kahdeksan päivää ennen poikimista. Suuntaa antavia eroja geenitoiminnassa ryhmien välillä oli kahdeksan päivää ennen poikimista *ADIPOQ*- ja *RES*-geeneillä, päivä poikimisen jälkeen *HSL*-geenillä ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen *ARI*-geenillä.

Taulukko 5. Geenitoiminnassa havaittavat erot kontrolli- ja koeryhmien välillä eri näytteenottoajankohtina

| Geeni | Kontrolli- ja koeryhmän ero, -8 päivää | Kontrolli- ja koeryhmän ero, +1 päivä | Kontrolli- ja koeryhmän ero, +9 päivää |
|--------------------------------|---|--|---|
| <i>ADIPOQ</i> | 0,059 o 3,574 | 0,294 1,103 | 0,749 0,102 |
| <i>AR1</i> | 1,000 0,000 | 0,208 1,588 | 0,085 o 2,976 |
| <i>AR2</i> | 0,916 0,011 | 0,248 1,335 | 0,142 2,159 |
| <i>HSL</i> | 0,834 0,044 | 0,093 o 2,824 | 0,565 0,331 |
| <i>IL6</i> | 0,248 1,335 | 0,834 0,044 | 0,142 2,159 |
| <i>IRS1</i> | 0,021 * 5,338 | 0,834 0,044 | 0,225 1,474 |
| <i>LEP</i> | 0,294 1,103 | 0,142 2,162 | 0,749 0,102 |
| <i>LPL</i> | 0,600 0,276 | 0,753 0,099 | 0,180 1,800 |
| <i>PCK1</i> | 0,338 0,918 | 0,834 0,044 | 0,655 0,200 |
| <i>PPARγ</i> | 0,916 0,011 | 0,401 0,706 | 0,338 0,918 |
| <i>RBP4</i> | 0,345 0,893 | 0,916 0,011 | 0,142 2,159 |
| <i>RES</i> | 0,074 o 3,188 | 0,834 0,044 | 0,225 1,474 |
| <i>SCD</i> | 0,294 1,103 | 0,208 1,588 | 0,482 0,494 |
| <i>TNFα</i> | 0,916 0,011 | 0,834 0,044 | 0,406 0,690 |

***($P < 0,001$), **($P < 0,01$), *($P < 0,05$) ja o($P < 0,10$)

Ylempi luku on riskitaso (p) ja alempi luku testisuure (χ^2).

5.3 Insuliiniresistenssin arviointi

5.3.1 Koko aineiston keskimääräisen geenitoiminnan muutos

Kirjallisuuden perusteella kullekin geenille määritettiin geenitoiminnan muutoksen suunta insuliiniresistenssissä (Taulukko 6). Koko aineiston geenitoiminnan muutoksen analyysissä tilastollisesti merkitsevimpinä havaittiin *LEP*- ja *SCD*-geenien toiminnan keskimääräinen väheneminen poikimisen jälkeen (Taulukko 4). Heikomman tilastollisen merkitsevyyden geenitoiminnan keskimääräisessä muutoksessa antoivat *ADIPOQ*-, *PCK1*-, *PPAR γ* -, *RBP4*- ja *RES*-geenit, joista *RES*:ta lukuun ottamatta kaikkien keskimääräinen geenitoiminta väheni poikimisen jälkeen. Näistä *LEP*- ja *SCD*-geenien toiminta muuttui insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti ja *ADIPOQ*-, *PPAR γ* - ja *RES*-geenien toiminnan keskimääräinen muutos oli yhteneväinen insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan muutoksen suhteen.

Taulukko 6. Geenitoiminnan muutokset insuliiniresistenssissä

| Geeni | Geenitoiminnan muutos |
|--------------------------------|-----------------------|
| <i>ADIPOQ</i> | ↓ |
| <i>AR1</i> | ↓ |
| <i>AR2</i> | ↓ |
| <i>HSL</i> | ↑ |
| <i>IL6</i> | ↑ |
| <i>IRS1</i> | ↓ |
| <i>LEP</i> | ↑ |
| <i>LPL</i> | ↓ |
| <i>PCK1</i> | ↑ |
| <i>PPARγ</i> | ↓ |
| <i>RBP4</i> | ↑ |
| <i>RES</i> | ↑ |
| <i>SCD</i> | ↑ |
| <i>TNFα</i> | ↑ |

5.3.2 Geenitoiminnan muutos ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen

Tutkimuksessa verrattiin geenitoimintojen muutoksien suuntaa aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen. Geenitoiminnan muutosta analysoitiin sekä koko aineistolla että erikseen koe- ja kontrolliryhmillä. Kahden mittausajankohdan välistä geenitoiminnan eroa mitattiin merkkitestillä verraten muuttujien ΔC_t -arvoja ja määrittäen geenitoiminnan muutoksen suunta yksilöittäin ja tämän jälkeen yhdistäen aineistot. Tarkasteltaessa koko aineistoa kahdeksan geeniä, *LEP* ($P=0,006$), *SCD* ($P=0,001$) sekä *ADIPOQ*, *IRS1*, *LPL*, *PCK1*, *PPAR γ* ja *RES* ($P=0,029$), osoittivat tilastollisesti merkitsevää muutosta geenitoiminnassa ja kolme, *AR2*, *HSL* ja *RBP4* ($P=0,09$), tilastollisesti suuntaa antavaa muutosta (Taulukko 7). Näistä *HSL*-, *LEP*-, *PCK1*-, *RBP4*- sekä *SCD*-geenien toiminta muuttui insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti. Tarkasteltaessa geenitoiminnan muutosta mittausajankohtien välillä ryhmittäin koeryhmällä havaittiin vain suuntaa antavaa muutosta geenitoiminnassa *SCD*-geenillä ($P=0,062$). Kontrolliryhmällä havaittiin tilastollisesti merkitsevää muutosta geenitoiminnassa *ADIPOQ*- *IRS1*-, *LEP*- ja *SCD*-geeneillä ($P(\text{ADIPOQ})=0,029$, $P(\text{IRS1}, \text{LEP}, \text{SCD})=0,008$) sekä tilastollisesti suuntaa antavaa muutosta *AR1*-, *AR2*-, *HSL*-, *IL6*-, *LPL*-, *PPAR γ* - ja *RES*-geeneillä ($P=0,062$). Näistä insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti muuttuivat *HSL*, *IL6*, *LEP* sekä *SCD*.

Taulukko 7. Geenitoiminnan muutos aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen

| | Koko aineisto | | Kontrolliryhmä | | Koeryhmä | | Insuliini- resistenssi |
|--------------------------------|-------------------------------|----------|-------------------------------|----------|-------------------------------|---------|-------------------------------|
| | Geeni- toiminnan muutos | P | Geeni- toiminnan muutos | P | Geeni- toiminnan muutos | P | Geeni- toiminnan muutos |
| <i>ADIPOQ</i> | ↓ | 0,029 * | ↓ | 0,029 * | ↓ | 0,227 | ↓ |
| <i>AR1</i> | ↑ | 0,212 | ↓ | 0,062 o | ↑ | >0,227 | ↓ |
| <i>AR2</i> | ↓ | 0,090 o | ↓ | 0,062 o | ↓ | >0,227 | ↓ |
| <i>HSL</i> | ↓ | 0,090 o | ↓ | 0,062 o | ↓ | >0,227 | ↑ |
| <i>IL6</i> | ↓ | >0,212 | ↓ | 0,062 o | ↑ | 0,227 | ↑ |
| <i>IRS1</i> | ↓ | 0,029 * | ↓ | 0,008 ** | ↑ | >0,227 | ↓ |
| <i>LEP</i> | ↓ | 0,006 ** | ↓ | 0,008 ** | ↓ | 0,227 | ↑ |
| <i>LPL</i> | ↓ | 0,029 * | ↓ | 0,062 o | ↓ | 0,227 | ↓ |
| <i>PCK1</i> | ↓ | 0,046 * | ↓ | 0,109 | ↓ | 0,227 | ↑ |
| <i>PPARγ</i> | ↓ | 0,029 * | ↓ | 0,062 o | ↓ | 0,227 | ↓ |
| <i>RBP4</i> | ↓ | 0,090 o | ↓ | 0,227 | ↓ | 0,227 | ↑ |
| <i>RES</i> | ↑ | 0,029 * | ↑ | 0,062 o | ↑ | 0,227 | ↑ |
| <i>SCD</i> | ↓ | 0,001*** | ↓ | 0,008 ** | ↓ | 0,062 o | ↑ |
| <i>TNFα</i> | ↔ | | ↓ | >0,227 | ↑ | >0,227 | ↑ |

***($P < 0,001$), **($P < 0,01$), *($P < 0,05$) ja o($P < 0,10$)

5.3.3 Geenitoiminnan muutos yksilöittäin

Merkkitestiä käyttäen testattiin kunkin yksilön kaikkien geenien toiminnan muutos poikimisen jälkeen ja verrattiin sitä asetettuun hypoteesiin insuliiniresistenssin geenitoiminnan suhteen. Vain yksi kontrolliryhmän lehmä osoitti tilastollisesti suuntaa antavaa geenitoiminnan muutosta insuliiniresistenssin geenitoiminnan muutoksen suuntaan ($P=0,09$). Yksi kontrolliryhmän lehmä osoitti tilastollisesti merkitsevää muutosta geenitoiminnassaan insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti ($P=0,029$).

5.3.4 Ryhmien keskimääräinen geenitoiminnan muutos poikimisen jälkeen

Poikimisen jälkeen havaitun yksilöllisen geenitoiminnan muutoksen perusteella verrattiin kumpi ryhmä keskimäärin yksilömäärään perustuen vastaa geenitoiminnaltaan insuliiniresistentimpää ryhmää. Ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää

eroa ($P>0,212$). Kontrolliryhmässä havaittiin kahdeksalla geenillä insuliiniresistenssiin liittyvää geenitoiminnan muutosta useammalla yksilöllä kuin koeryhmässä ja vastaavasti kuudella geenillä insuliiniresistenssiin liittyvää geenitoiminnan muutosta oli havaittavissa useammalla yksilöllä koeryhmässä.

6 TULOSTEN TARKASTELU

6.1 Geenitoiminnan erot eri tarkastelutasoilla

6.1.1 Geenitoiminnan erot koko aineistolla näytteenottoajankohtien välillä

Koko aineiston tarkastelu rasvakudoksen geenitoiminnan muutoksen suhteen tutkittavilla geeneillä osoitti, että seitsemällä geenillä geenitoiminnassa oli tapahtunut muutosta koko tutkittavalla aikavälillä. Geeneillä, joilla geenitoiminnan muutosta havaittiin, olivat *ADIPOQ*, *LEP*, *RES*, *SCD*, *PCK1*, *PPAR γ* ja *RBP4*. Tarkasteltaessa geenien eri näytteenottoajankohtien keskimääräisiä ΔC_T -arvoja (LIITE 2) voitiin havaita kunkin geenin muutoksen suunta. Suurinta tilastollista merkitsevyyttä geenitoiminnan muutoksessa osoittivat *LEP*- ja *SCD*-geenit, joiden geenitoiminnan havaittiin vähentyneen poikimisen jälkeen verrattuna geenitoiminnan määrään ennen poikimista. Vertailemalla näiden geenien näytteenottoajankohtien $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -arvoja havaittiin, että 1 ja 9 päivää poikimisen jälkeen *LEP*-geenin toiminta oli keskimäärin 49 % toiminnan määrästä 8 päivää ennen poikimista ja *SCD*-geenin toiminta oli keskimäärin 69 % toiminnan määrästä 8 päivää ennen poikimista. Nämä ovat geenejä, joiden toiminta vähenee laktaation alkaessa ja metabolisen stressin voimistuessa. Tarkasteltaessa muiden tilastollisesti merkitsevien geenien ΔC_T -arvojen keskiarvoja havaittiin, että *ADIPOQ*-, *PCK1*-, *PPAR γ* - ja *RBP4*-geenien toiminta väheni poikimisen jälkeen ja *RES*-geenin toiminta lisääntyi.

6.1.2 Geenitoiminnan erot koe- ja kontrolliryhmien välillä eri näytteenottoajankohtina

Tutkimuksen hypoteesina oli, että koeryhmän lehmien tulisi olla lihavampia ja täten niiden insuliiniresistenssin tulisi olla voimakkaampi kuin kontrolliryhmän lehmillä.

Tarkasteltaessa kontrolli- ja koeryhmien välisiä geenitoiminnan eroja eri näytteenottoajankohdilla havaittiin, että vain *IRS1* osoitti tilastollisesti merkitsevää eroa geenitoiminnassa ryhmien välillä ennen poikimista. *ADIPOQ*- ja *RES*-geenien toiminnassa oli havaittavissa tilastollisesti suuntaa antavaa eroa geenitoiminnassa ryhmien välillä ennen poikimista. Päivä poikimisen jälkeen *HSL* osoitti tilastollisesti suuntaa antavaa eroa ryhmien välisessä geenitoiminnassa ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen *ARI*.

Vertailemalla kontrolli- ja koeryhmien *IRS1*-geenin ΔC_t -arvoja havaittiin kontrolliryhmän *IRS1*-geenitoiminnan olevan koeryhmän geenitoimintaa suurempaa. Erion ja Shulman (2010) ehdottivat tutkimuksessaan, että maksa- ja lihassoluissa rasvahappojen nettolisäys voi johtaa *PKC*:n aktivoitumiseen, joka liittyy *IRS1*:n aktiivisuuden alenemiseen ja insuliinin toiminnan inhiboitumiseen. Tässä tutkimuksessa havaittiin, että ennen poikimista koeryhmän veren vapaiden rasvahappojen pitoisuus oli kontrolliryhmän pitoisuutta pienempi ($P < 0,03$), veren insuliinipitoisuus suurempi ($P < 0,09$) ja *IRS1*:n geenitoiminta alhaisempi ($P = 0,021$). Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä, että rasvakudoksen reaktio veren lisääntyneisiin vapaisiin rasvahappoihin ja siitä seuraaviin reaktioihin ei ole samanlainen maksa- ja lihaskudoksen kanssa. Poikimisen lähestyessä veren insuliinipitoisuus alenee ja rasvakudoksen mobilisaatio lisääntyy (Kokkonen ym. 2010) ja *IRS1*:n geenitoiminta vähenee (Stephens ym. 1997). *IRS1*:n geenitoiminnan muutoksen perusteella koeryhmä on kontrolliryhmää insuliiniresistentimpi, mutta veren insuliini- ja vapaiden rasvahappojen pitoisuuden perusteella insuliiniresistentimpi ryhmä on kontrolliryhmä.

Tilastollisesti suuntaa antavat geenitoiminnan erot ryhmien välillä ennen poikimista geeneissä *ADIPOQ* ja *RES* eivät täysin tue sitä, että koeryhmä olisi insuliiniresistentimpi. Insuliiniresistenssissä *ADIPOQ*:in geenitoiminnan tulisi vähentyä ja *RES*:n lisääntyä. Vertailemalla kontrolli- ja koeryhmien ΔC_t -arvoja havaittiin, että *ADIPOQ*:n geenitoiminta oli pienempää koeryhmällä ja *RES*:n suurempaa kontrolliryhmällä. Mikäli oletetaan, että koeryhmä olisi kontrolliryhmää insuliiniresistentimpi, tulisi koeryhmän *RES*:n geenitoiminnan olla kontrolliryhmää suurempaa.

Poikimisen jälkeen suuntaa antavia eroja geenitoiminnassa osoittivat *HSL* päivä poikimisen jälkeen ja *ARI* yhdeksän päivää poikimisen jälkeen. Insuliiniresistenssin

geenitoiminnan muutoksen mukaan *HSL*:n geenitoiminnan tulisi lisääntyä ja *ARI*:n vähentyä. Vertailemalla näiden geenien ΔC_T -arvoja havaittiin, että päivä poikimisen jälkeen geenitoiminta *HSL*-geenillä oli suurempaa ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen geenitoiminta *ARI*-geenillä pienempää kontrolliryhmällä. Geenitoimintojen erot ryhmien välillä olivat tilastollisesti vain suuntaa antavia, mutta kummankin kohdalla insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan mukaan kontrolliryhmä on insuliiniresistentimpi kyseisellä ajankohdalla.

Tarkastelemalla poikimisen jälkeen suuntaa antavien geenitoiminnan geenien keskimääräisiä ΔC_T -arvoja (LIITE 2) yli näytteenottoajankohtien voidaan havaita, että aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja päivä poikimisen jälkeen *HSL*:n geenitoiminta on vähentynyt molemmilla ryhmillä ja aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen *ARI*:n geenitoiminta on koeryhmällä lisääntynyt ja kontrolliryhmällä vähentynyt. Näiden havaintojen puitteissa voidaan sanoa, että *HSL*:n geenitoiminnan muutos molemmilla ryhmillä vastaa insuliiniresistenssiin liittyvää geenitoiminnan muutosta, mutta *ARI*:n geenitoiminnan muutos vastaa insuliiniresistenssiin liittyvää geenitoiminnan muutosta vain kontrolliryhmän osalta.

6.2 Insuliiniresistenssin arviointi

6.2.1 Koko aineiston keskimääräisen geenitoiminnan muutos

Havaittuja geenitoiminnan muutoksia ja niiden suuntia verrattiin insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan muutokseen. Tilastollisesti merkitsevimmät geenitoiminnan muutokset havaittiin *LEP*- ja *SCD*-geenien toiminnan muutoksissa, joiden kummankin geenitoiminta keskimäärin väheni poikimisen jälkeen. Insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan mukaan kummankin geenin toiminnan tulisi lisääntyä, joten tämän tutkimuksen tulokset eivät ole yhteneviä insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan kanssa. Heikompaa tilastollista merkitsevyyttä geenitoiminnan keskimääräisessä muutoksessa havaittiin *ADIPOQ*-, *PCK1*-, *PPAR γ* -, *RBP4*- ja *RES*-geeneillä. Näistä *RES*:n keskimääräisen geenitoiminnan havaittiin lisääntyneen poikimisen jälkeen ja muiden vähentyneen. Näistä vain *ADIPOQ*-, *PPAR γ* - ja *RES*-geenien keskimääräinen

toiminnan muutos on yhteneväinen insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan kanssa. Näin ollen seitsemästä tilastollista merkitsevyyttä osoittavasta geenitoiminnan keskimääräisestä muutoksesta vain kolmen geenitoiminta muuttui insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan mukaisesti. Koko aineiston geenitoiminnan keskimääräistä muutosta tarkastellen aineistosta ei ole havaittavissa insuliiniresistenssin piirteitä.

6.2.2 Geenitoiminnan muutos ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen

Tarkasteltaessa koko aineiston geenitoiminnan muutosta kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen havaittiin, että 11 geenin toiminta oli muuttunut tilastollisesti merkitsevästi tai suuntaa antavasti. Tilastollisesti merkitsevästi geenitoiminnan muuttumista havaittiin *ADIPOQ*-, *IRS1*-, *LEP*-, *LPL*-, *PCK1*-, *PPAR γ* -, *RES*- ja *SCD*-geenien kohdalla. Näistä insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan suuntaan olivat muuttuneet *ADIPOQ*, *IRS1*, *LPL*, *PPAR γ* ja *RES* ja vastaavasti insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti *LEP*, *PCK1* ja *SCD*. Tilastollisesti suuntaa antavia geenitoiminnan muutoksia osoittivat *AR2*, *HSL* ja *RBP4*. Näistä geeneistä vain *AR2*:n geenitoiminnan muutos oli insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan suuntaista.

Kontrolliryhmän geenitoiminnan muutoksessa tilastollista merkitsevyyttä tai suuntaa antavuutta havaittiin 11 geenillä. Tilastollisesti merkitseviä geenitoiminnan muutoksen osoittajia olivat *ADIPOQ*, *IRS1*, *LEP* ja *SCD*. Näistä *ADIPOQ*- ja *IRS1*-geenien toiminnan muutoksen olivat insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan suuntaisia. Tilastollisesti suuntaa osoittivat geenitoiminnan muutoksessaan *ARI*, *AR2*, *HSL*, *IL6*, *LPL*, *PPAR γ* ja *RES*, joista insuliiniresistenssin geenitoiminnan suuntaan olivat muuttuneet *ARI*, *AR2*, *LPL*, *PPAR γ* ja *RES*. Koeryhmällä yhdelläkään geenillä ei havaittu tilastollista merkitsevyyttä geenitoiminnan muutoksessa, mutta *SCD*:n geenitoiminnan havaittiin tilastollisesti suuntaa antavasti muuttuneen. Tämä muutos tapahtui insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti.

Suurin ero geenitoiminnassa kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen oli *SCD*:llä. Se oli ainoa geeni, joka osoitti tilastollista merkitsevyyttä tai suuntaa antavuutta sekä koko aineistolla, kontrolliryhmällä että koeryhmällä. Kussakin ryhmässä *SCD*:n geenitoiminta väheni. *LEP*:n geenitoiminnassa

havaittiin koko aineistolla ja kontrolliryhmällä tilastollisesti merkitsevää muutosta sen geenitoiminnan vähentyessä. Insuliiniresistenssissä *LEP*:n ja *SCD*:n geenitoiminnan tulisi lisääntyä. Tulokset viittaavat siihen, että ryhmien välillä geenitoiminnan ajalliset muutokset eroavat ja ne viittaavat eroihin insuliiniresistenssin voimakkuudesta.

6.2.3 Geenitoiminnan muutos yksilöittäin poikimisen jälkeen

Hypoteesissa oletettiin, että koeryhmän lehmien tulisi olla insuliiniresistentimpiä. Analysoitaessa yksilöittäin lehmien geenitoiminnan muutoksia merkkitestin avulla tulokset ovat ristiriitaisia. Niiden mukaan yksi kontrolliryhmän lehmä on geenitoiminnaltaan suuntaa antavasti insuliiniresistentti ja yksi tilastollisesti merkitsevästi ei-insuliiniresistentti. Tulosten perusteella ei voida todeta hypoteesin toteutumista.

6.2.4 Ryhmien keskimääräinen geenitoiminnan muutos poikimisen jälkeen

Poikimisen jälkeisen geenitoiminnan muutosta tarkastellen pyrittiin selvittämään, kumpi ryhmä on kaikkien geenien toiminnan perusteella keskimäärin insuliiniresistentimpi. Ryhmien välillä ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa. Kuudella geenillä koeryhmässä havaittiin useammalla yksilöllä muutosta insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan suuntaan ja kahdeksalla geenillä kontrolliryhmässä. Ryhmien välinen ero geenitoiminnoissa ei riitä tukemaan eikä kumoamaan väitettä, että jompikumpi ryhmistä olisi insuliiniresistentimpi.

6.3 Tulosten vertailu muihin tutkimustuloksiin

6.3.1 Tutkimustuloksia muista tutkimuksista

Sumnerin ja McNamaran (2007) tutkimuksessa lehmien ihonalaisen rasvakudoksen lipolyyttisten geenien geenitoimintaa tutkittiin ottamalla biopsiat rasvakudoksesta 30 päivää ennen poikimista sekä 30, 90 ja 270 päivää poikimisen jälkeen. Tutkimuksessa tutkittiin yhtä tämän tutkimuksen kanssa samaa geeniä, mikä oli *HSL*. Sumner ja

McNamara (2007) totesivat, että *HSL*:n geenitoiminta lisääntyi poikimisen jälkeen ($P=0,09$).

Lemor ym. (2009) vertasivat tutkimuksessaan lypsylehmien rasvakudoksen geenitoimintaa keskimäärin viikkoa ennen poikimista ja kolme viikkoa poikimisen jälkeen. Ensimmäinen biopsia otettiin 2-13 päivää ennen poikimista ja toinen 20-23 päivää poikimisen jälkeen. Tutkimusten tulosten mukaan *ADIPOQ* tai *LEP* ei osoittanut tilastollisesti merkitsevää muutosta geenitoiminnassa näytteenottoajankohtien välillä, mutta *ARI* ja *AR2* osoittivat geenitoiminnan vähenemistä poikimisen jälkeen ($P\leq 0,05$).

Lypsylehmien ihonalaisen rasvakudoksen geenitoimintaa tutkineet Sadri ym. (2010) tutkivat *TNF α* :n ja insuliinisignaalointiin liittyvien tekijöiden geenitoiminnan muutosta. Tutkimuksessa verrattiin rasvakudoksen näytteitä, jotka oli otettu kahdeksan viikkoa ennen poikimista, päivä poikimisen jälkeen ja viisi viikkoa poikimisen jälkeen. Tutkimustulokset osoittivat, että *IRS1*:n geenitoiminnassa ei havaittu tilastollisesti merkitsevää muutosta, mutta *TNF α* :n geenitoiminta lisääntyi poikimisen jälkeen tilastollisesti merkitsevästi ($P=0,006$).

Sadri ym. (2011) tutkivat plasman leptiinipitoisuuden muutosta ja sen vaikutusta lipogeneettisten ja lipolyyttisten geenien toimintaan rasvakudoksessa. Kyseisessä tutkimuksessa käytettiin myös rasvakudoksen näytteitä, jotka oli otettu kahdeksan viikkoa ennen poikimista, päivä poikimisen jälkeen ja viisi viikkoa poikimisen jälkeen. Tutkimuksessa oli mukana viisi samaa geeniä tämän tutkimuksen kanssa, jotka olivat *ARI*, *AR2*, *HSL*, *LEP* ja *LPL*, joista mikään ei kuitenkaan osoittanut tilastollisesti merkitsevää muutosta geenitoiminnassa. Sumner-Thomson ym. (2011) tutkivat myös lypsylehmien rasvakudoksen geenitoimintaa ottaen biopsiat rasvakudoksesta 30 päivää ennen poikimista ja 14 päivää poikimisen jälkeen. Tutkimuksessa havaittiin, että *LEP*- ja *SCD*-geenien toiminta väheni tilastollisesti merkitsevästi ($P(\textit{LEP})=0,004$ ja $P(\textit{SCD})=0,008$). *LPL*:n geenitoiminnan todettiin vähentyneen ($P=0,002$). *HSL*:n geenitoiminnan muutoksessa ei havaittu tilastollista merkitsevyyttä.

Edellä mainituilla tutkimuksilla on yhtäläisyyksiä tämän tutkimuksen koeasetelmien kanssa, mutta näytteenottoajankohtien ja käsittelyjen erilaisuus vaikeuttaa vertailua. Tutkimuksista parhaiten vertailukelpoisina tämän tutkimuksen kanssa näytteenottoajankohtien suhteen voidaan pitää Lemorin ym. (2009) ja Sumner-

Thomsonin ym. (2011) tutkimuksia. Yhteenveto julkaistujen tutkimusten tuloksista on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. Julkaistut tutkimustulokset poikimisen jälkeen tapahtuvasta geenitoiminnan muutoksesta tässä tutkimuksessa tutkituilta geeneiltä

| | Geeni | P | Geenitoiminnan muutos |
|------------------------------|---------------|-------|--------------------------|
| Sumner ja McNamara (2007) | <i>HSL</i> | 0,09 | ↑ |
| Lemor ym. (2009) | <i>ADIPOQ</i> | | - |
| | <i>AR1</i> | ≤0,05 | ↓ |
| | <i>AR2</i> | ≤0,05 | ↓ |
| | <i>LEP</i> | | - |
| Sadri ym. (2010) | <i>IRS1</i> | | - |
| | <i>TNFα</i> | 0,006 | ↑ |
| Sadri ym. (2011) | <i>AR1</i> | | - |
| | <i>AR2</i> | | - |
| | <i>HSL</i> | | - |
| | <i>LEP</i> | | - |
| | <i>LPL</i> | | - |
| Sumner-Thomson ym. (2011) | <i>HSL</i> | | - |
| | <i>LEP</i> | 0,004 | ↓ |
| | <i>LPL</i> | 0,002 | ↓ |
| | <i>SCD</i> | 0,008 | ↓ |

6.3.2 Koko aineiston keskimääräisen geenitoiminnan muutos

Toisin kuin Sumnerin ja McNamaran (2007) tutkimuksessa (Taulukko 8), tässä tutkimuksessa *HSL*:n keskimääräisessä geenitoiminnassa poikimisen jälkeen ei havaittu tilastollista muutosta (Taulukko 9) verrattaessa sitä ennen poikimista havaittuun geenitoimintaan. Lemorin ym. (2009) havaitsemat geenitoiminnan muutokset (Taulukko 8) ovat tilastolliselta merkitsevyydeltään päinvastaisia tämän tutkimusten tulosten kanssa. Myös Sadrin ym. (2010) havaitsemat tilastollisesti merkitsevät erot (Taulukko 8) ovat päinvastaisia tämän tutkimuksen tulosten kanssa. Sadrin ym. (2011) saamien tutkimustulosten (Taulukko 8) kanssa havaitaan yhteneväisyyttä tämän tutkimuksen tulosten kanssa. Kummassakaan tutkimuksessa *AR1*, *AR2*, *HSL* tai *LPL* eivät osoittaneet tilastollista merkitsevyyttä geenitoiminnan muutoksessa. Sadri ym. (2011) eivät havainneet myöskään tilastollista muutosta *LEP*-geenin toiminnan muutoksessa

(Taulukko 8) toisin kuin tässä tutkimuksessa, jossa *LEP*-geenin muutos oli tilastollisesti merkitsevää ($P=0,001$). Tämän tutkimuksen tulokset ovat yhteneviä Sumner-Thomson ym. (2011) kanssa (Taulukko 8) *LEP*- ja *SCD*-geenien toiminnan muutoksesta, mutta eroavat *LPL*-geenin osalta siten, että tässä tutkimuksessa geenitoiminnassa ei havaittu eroa. *HSL*:llä kumpikaan tutkimus ei osoittanut tilastollista merkitsevyyttä geenitoiminnan muutoksessa.

Taulukko 9. Muissa tutkimuksissa tutkittujen geenien toiminnan muutos tässä tutkimuksessa

| | Kolmen | | Välillä -8d ja +9d | |
|-------------------------------|--------------------------|---------------|--------------------|-----------|
| | näytteenottoajan välillä | | | |
| | Koko aineisto | Koko aineisto | Kontrolliryhmä | Koeryhmä |
| | P, muutos | P, muutos | P, muutos | P, muutos |
| <i>ADIPOQ</i> | 0,021, ↓ | 0,029, ↓ | 0,029, ↓ | - |
| <i>AR1</i> | - | - | 0,062, ↓ | - |
| <i>AR2</i> | - | 0,090, ↓ | 0,062, ↓ | - |
| <i>HSL</i> | - | 0,090, ↓ | 0,062, ↓ | - |
| <i>IRS1</i> | - | 0,029, ↓ | 0,008, ↓ | - |
| <i>LEP</i> | 0,001, ↓ | 0,006, ↓ | 0,008, ↓ | - |
| <i>LPL</i> | - | 0,029, ↓ | 0,062, ↓ | - |
| <i>SCD</i> | 0,0004, ↓ | 0,001, ↓ | 0,008, ↓ | 0,062, ↓ |
| <i>TNFα</i> | - | - | - | - |

6.3.3 Koko aineiston geenitoiminnan muutos aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen

Geenitoiminnan muutosta tarkasteltiin merkkitestin avulla aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen. Muutosta tarkasteltiin sekä koko aineistoa käyttäen että kontrolli- ja koeryhmien sisällä. Havaintoja verrattiin muiden samoja geenejä tutkineiden tutkimusten tuloksiin. Koko aineistoa tarkastelemassa havaittiin, että seitsemällä geenillä (Taulukko 9), joita myös edellä mainituissa tutkimuksissa on tutkittu (Taulukko 8), geenitoiminnassa oli muutosta. Tässä tutkimuksessa tilastollisesti merkitsevä muutos geenitoiminnassa havaittiin *ADIPOQ*-, *IRS1*-, *LEP*-, *LPL*- ja *SCD*-geeneillä ja tilastollisesti suuntaa antava muutos *AR2*- ja *HSL*-geeneillä. Sumner ja McNamara (2007) havaitsivat *HSL*:n geenitoiminnan lisääntyvän poikimisen jälkeen ($P=0,09$), kun taas tässä tutkimuksessa *HSL*:n geenitoiminnan havaittiin vähentyneen ($P=0,09$). Lemor ym. (2009) eivät havainneet

ADIPOQ- tai *LEP*-geeneillä muutosta geenitoiminnassa, mutta havaitsivat *AR2:n* geenitoiminnan pienentyneen ($P \leq 0,05$) poikimisen jälkeen. Tässä tutkimuksessa *AR2:n* geenitoiminnan havaittiin myös laskeneen poikimisen jälkeen ($P=0,09$). Sadri ym. (2010) eivät havainneet *IRS1:n* geenitoiminnassa muutosta eivätkä Sadri ym. (2011) muutosta *AR1:n*, *AR2:n*, *HSL:n*, *LEP:n* tai *LPL:n* geenitoiminnassa. Tämän tutkimuksen tulokset ovat yhteneviä vain Sadrin ym. (2011) havainnon *AR1:n* geenitoiminnan suhteen siten, ettei kumpikaan tutkimus havainnut geenitoiminnassa muutosta. Sumner-Thomsonin ym. (2011) ja tämän tutkimuksen tuloksissa yhtenevää on *LEP*-, *LPL*- ja *SCD*-geenien toiminnassa havaittava väheneminen.

6.3.4 Kontrolliryhmän geenitoiminnan muutos aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen

Kontrolliryhmän geenitoiminnassa havaittiin muissa tutkimuksissa tutkituista geeneistä *ADIPOQ*-, *IRS1*-, *LEP*- ja *SCD*-geeneillä geenitoiminnassa tilastollisesti merkitsevää muutosta ja *AR1*-, *AR2*-, *HSL*- ja *LPL*-geeneillä tilastollisesti suuntaa antavaa muutosta (Taulukko 9). Verrattaessa tämän tuloksen tutkimuksia Sumnerin ja McNamaran (2007) tuloksiin todettiin, että *HSL:n* geenitoiminnassa havaittava muutos on tutkimuksissa päinvastainen. Lemorin ym. (2009) tutkimuksen tulosten kanssa yhtenevä tulos geenitoiminnan muutoksesta havaittiin *AR1*- ja *AR2*-geeneillä, mutta *ADIPOQ*- ja *LEP*-geenien toiminnassa Lemor ym. (2009) eivät havainneet muutosta. Sadrin ym. (2010) ja Sadrin ym. (2011) tulokset geenitoiminnan muutoksesta olivat tämän tutkimuksen tulosten kanssa päinvastaisia tilastollisen merkitsevyyden suhteen. Sumner-Thomsonin ym. (2011) tulokset *LEP*-, *SCD*- ja *LPL*-geenien toiminnan vähenemisestä poikimisen jälkeen olivat yhteneviä tämän tutkimuksen tuloksen suhteen, mutta *HSL:n* geenitoiminnassa havaittiin myös tässä tutkimuksessa tilastollisesti suuntaa antavaa muutosta.

6.3.5 Koeryhmän geenitoiminnan muutos aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen

Koeryhmällä vain *SCD*:llä havaittiin suuntaa antavaa muutosta geenitoiminnassa (Taulukko 9) sen geenitoiminnan vähentyessä, joka on Sumner-Thomsonin ym. (2011)

tuloksen kanssa yhtenevä. Muita muiden tutkimustulosten kanssa yhteneviä tuloksia havaittiin geenitoiminnan tilastollisessa merkitsemättömyydessä. Lemor ym. (2009) eivät havainneet *ADIPOQ*- tai *LEP*-geeneillä, Sadri ym. (2010) *IRS1*-geenillä, Sadri ym. (2011) *AR1*-, *AR2*-, *HSL*-, *LEP*- tai *LPL*-geeneillä ja Sumner-Thomsin ym. (2011) *HSL*-geenillä muutosta geenitoiminnassa.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tilastollisesti merkitsevimpien geenitoimintojen, *LEP*:n ja *SCD*:n, havaitut geenitoiminnan muutokset olivat odotusten mukaisia. Ne ovat lipolyyttisiä geenejä, joiden toiminnan lisääntyminen liittyy laktaation alkamiseen ja voimistuvaan metaboliseen stressiin energiataseen muuttuessa negatiiviseksi. Myös *RES*-geenin toiminnan lisääntyminen poikimisen jälkeen vastasi odotettua poikimisen jälkeistä geenitoiminnan muutosta.

Geenitoiminnoissa ryhmien välillä eri näytteenottoajankohtina havaittiin tilastollisesti merkitsevää eroa ennen poikimista *IRS1*-geenillä, jolla geenitoiminnan havaittiin olevan vähäisempää koeryhmällä. Hypoteesin mukaan insuliiniresistenssissä *IRS1*:n geenitoiminnan tulee vähetä, joten koeryhmä on tämän perusteella insuliiniresistentimpi.

Verrattaessa kolmen näytteenottoajankohdan välillä havaittuja geenitoiminnan eroja koko aineistossa, seitsemän geeniä osoitti tilastollisesti merkitsevää muutosta, joista neljän toiminta oli muuttunut insuliiniresistenssin geenitoiminnan vastaisesti. Tarkastelemalla geenitoiminnan muutosta aikavälillä kahdeksan päivää ennen poikimista ja yhdeksän päivää poikimisen jälkeen sekä koko aineistolla että kontrolliryhmällä havaittiin 11 geenin toiminnassa muutosta. Näistä insuliiniresistenssiin liittyvän geenitoiminnan vastaisesti olivat koko aineistolla muuttuneet viisi ja kontrolliryhmällä neljä geeniä. Koeryhmällä vain yhdellä geenillä havaittiin insuliiniresistenssin kanssa yhteen sopimaton muutos geenitoiminnassa.

Yksilöllisen geenitoiminnan muutoksia poikimisen jälkeen tarkastelemalla kontrolliryhmässä havaittiin yksi suuntaa-antavasti insuliiniresistenssin geenitoiminnan muutoksen suuntaan muuttunut ja yksi tilastollisesti merkitsevästi insuliiniresistenssin

geenitoiminnan muutoksen suuntaa vastaan muuttunut yksilö. Verrattaessa geeneittäin ryhmiä ja niiden insuliiniresistenssin geenitoiminnan suuntaan muuttuneita yksilömääriä ei ryhmien välillä havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa.

Poikiminen ja maidontuotannon alkaminen kiihdyttävät metabolista stressiä ja insuliiniresistenssiä, joita ruokinnasta ummessaolokaudella saatava ylimääräinen energia ja korkea tuotostaso voimistavat. Tutkimuksen tulosten perusteella koeryhmän geenitoiminnassa ei havaittu yhtä merkitseviä eroja poikimisen jälkeen kuin kontrolliryhmällä. Tämä viittaa siihen, että koeryhmä oli geenitoiminnaltaan insuliiniresistentimpi jo ennen poikimista, ja kontrolliryhmän insuliiniresistenssi voimistui poikimisen jälkeen. *IRS1:n*, *LEP:n* ja *SCD:n* geenitoiminnoissa havaittavat tilastollisesti merkitsevät erot viittaavat siihen, että suuremman energiamäärän ummessaolokaudella saavat lypsylehmät ovat insuliiniresistentimpiä.

8 KIITOKSET

Haluan esittää kiitokset yliopistonlehtori Kari Elolle työn ohajuksesta sekä yliopistonlehtori Tuomo Kokkoselle ja tohtorikoulutettava Siru Salinille tiedonannoista.

LÄHTEET

- Ahima, R. S. & Flier, J. S. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11: 327-332.
- Arner, P. 2003. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14: 137-145.
- Bastard, J-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J. & Feve, B. 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network* 17: 4-12.
- Bionaz, M. & Loor, J. J. 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9: 366.
- Bornstein, S. R., Uhlmann, K., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M. & Scherbaum, W. A. 1997. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland. *Diabetes* 46: 1235-1238.
- Chagas, L. M., Lucy, M. C., Back, P. J., Blache, D., Lee, J. M., Gore, P. J. S. & Sheahan, A. J. 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. *Journal of Dairy Science* 92: 216-222.
- Chilliard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Leroux, C., Djiane, J. & Bocquier, F. 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology* 21: 271-295.
- Davies, F. F., Khandelwal, R. L. & Roesler, W. J. 1999. Troglitazone inhibits expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by an insulin-independent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 1451: 122-131.
- De Meijer, J. 1998. Hormone sensitive lipase: structure, function and regulation. <http://demeijer.com/biology/scriptie.pdf>. Opinnäytetyö. Utrechtin yliopisto, biologian tiedekunta, kokeellisen eläintieteen laitos. 42 s.
- Erion, D. E. & Shulman, G. I. 2010. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nature Medicine* 16: 400-402.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M. & Paschke, R. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 1084-1089.

- Friggens, N. C., Ingvarsen, K. L. & Emmans, G. C. 2004. Prediction of body lipid change in pregnancy and lactation. *Journal of Dairy Science* 87: 988-1000.
- Graham, T. E., Yang, Q., Blüher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wason, C. J., Oberbach, A., Jansson, P. A., Smith, U. & Kahn, B. B. 2006. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese and diabetic subjects. *The New England Journal of Medicine* 354: 2552-2563.
- Greenberg, A. S., Nordan, R. P., McIntosh, J., Calco, J. C., Scow, R. O. & Jablons, D. 1992. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in T3T-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Research* 52: 4113-4116.
- Hoeks, J., Hesselink, M. K. C., Russell, A. P., Mensink, M., Saris, W. H. M., Mensink, R. P. & Schrauwen, P. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 and insulin resistance: acute effect of fatty acids. *Diabetologia* 49: 2419-2426.
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. W. & Spiegelman, B. M. 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665-668.
- Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B. M. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 10697-10703.
- KEGG 2011. Adipocytokine signaling pathway. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04920. Kyoto, Japan: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Julkaistu 2011, viitattu 17.4.2012.
- KEGG 2012. Insulin signaling pathway. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bta04910. Kyoto, Japan: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Julkaistu 2012, viitattu 17.4.2012.
- Kern, P. A., Saghizadeh, M., Ong, J. M., Bosch, R. J., Deem, R. & Simsolo, R. B. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *The Journal of Clinical Investigation* 95: 2111-2119.
- Kern, P. A., Di Gregorio, G. B., Lu, T., Rassouli, N. & Ranganathan, G. 2003. Adiponectin expression from human adipose tissue. Relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes* 52: 1779-1785.
- Kokkonen, T., Taponen, J., Anttila, T., Syrjälä-Qvist, L., Delavaud, C., Chilliard, Y., Tuori, M. & Tesfa, A. T. 2005. Effects of body fatness and glucogenic supplement

- on lipid and protein mobilization and plasma leptin in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 1127-1141.
- Kokkonen, T., Mäntysaari, P. & Huhtanen, P. 2010. Lypsylehmän energiataseen mallintaminen. Teoksessa: *Maataloustieteen Päivät 2010*. Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisu no. 26.
- Komatsu, T., Itoh, F., Mikawa, S. & Hodate, K. 2003. Gene expression of resistin in adipose tissue and mammary gland of lactating and non-lactating cows. *Journal of Endocrinology* 178: R1-R5.
- Krogh-Madsen, R., Plomgaard, P., Keller, P., Keller, C. & Pedersen, B. K. 2003. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor- α gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 286: E234-E238.
- Lemor, A., Hosseini, A., Sauerwein, H. & Mielenz, M. 2009. Transition period-related changes in the abundance of the mRNAs of adiponectin and its receptors, of visfatin, and of fatty acid binding receptors in adipose tissue of high-yielding dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* 37: 37-44.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of the relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Loor, J. J. 2010. Genomics of metabolic adaptations in the peripartal cow. *Animal* 4: 1110-1139.
- Millward, C.A., DeSantis, D., Hsieh, C-H., Heaney, J.D., Pisano, S., Olswang, Y., Reshef, L., Beidelschies, M., Puchowicz, M. & Croniger, C.M. 2010. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1) helps regulate the triglyceride/fatty acid cycle and development of insulin resistance in mice. *The Journal of Lipid Research* 51: 1452–1463.
- MTT 2012. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. <http://www.mtt.fi/rehutaulukot>. Jokioinen, Suomi: MTT, Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. Viitattu 24.4.2012.
- Mukesh, M., Bionaz, M., Graugnard, D. E., Drackley, J. K. & Loor, J. J. 2010. Adipose tissue depots of Holstein cows are immune responsive: inflammatory gene expression in vitro. *Domestic Animal Endocrinology* 38: 168-178.
- Nielsen, A., Hameleers, A., Young, F. J., Larsen, T. & Friggens, N. C. 2010. Energy intake in late gestation affects blood metabolites in early lactation independently of milk production in dairy cows. *Animal* 4: 52-60.

- Ntambi, J. M. 1995. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Progress in Lipid Research* 34: 139-150.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoeckl, J. P., Lan, H., Kendziora, C. M., Yandell, B. S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. M. & Attie, A. D. 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11482-11486.
- Olefsky, J. M. & Saltier, A. R. 2000. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11: 362-368.
- Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasin, A., Elhanany, E., Kanety, H. & Zick, Y. 1997. A molecular basis for insulin resistance: Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 29911-29918.
- Peterson, J. A., Slepatis, R., Ehrhardt, R. A., Dunshea, F. R. & Bell, A. W. 1994. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates insulin suppression of fat mobilization in sheep. *The Journal of Nutrition* 124: 2431-2436.
- Pires, J. A. A., Souza, A. H & Grummer, R. R. 2007. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 90: 2735-2744.
- Pittas, A. G., Nandini, J. A. & Greenberg, A. S. 2004. Adipocytokines and insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 447-452.
- Renström, F., Burén, J., Svensson, M. & Eriksson, J. W. 2007. Insulin resistance induced by high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes. *Metabolism Clinical and Experimental* 56: 190-198.
- Reynisdottir, S., Angelin, B., Langin, D., Lithell, H., Eriksson, M., Holm, C. & Arner, P. 1997. Adipose tissue lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase, contrasting findings in familial combined hyperlipidemia and insulin resistance syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17: 2287-2292.
- Rozen, S. & Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. & Misener, S. (toim.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, s. 365-386.
- Sadri, H., Bruckmaier, R. M., Rahmani, H. R., Morel, I. & van Dorland, H. A. 2010. Gene expression of tumour necrosis factor alpha and insulin signalling-related

- factors in subcutaneous adipose tissue during the dry period and in early lactation in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94: e194-e202.
- Sadri, H., Mielenz, M., Morel, R., Bruckmaier, M. & van Dorland, H. A. 2011. Plasma leptin and mRNA expression of lipogenesis and lipolysis-related factors in bovine adipose tissue around parturition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95: 790-797.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. & Ragg, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7: 3.
- Sethi, J. K. & Hotamisligil, G. S. 1999. The role of TNF α in adipocyte metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10: 19-29.
- Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Stephens, J. M., Lee, J. & Pilch, P. F. 1997. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 971-976.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. & Lazar, M. A. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312.
- Sumner, J. M. & McNamara, J. P. 2007. Expression of lipolytic genes in the adipose tissue of pregnant and lactating Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 5237-5246.
- Sumner-Thomson, J. M., Vierck, J. L. & McNamara, J. P. 2011. Differential expression of genes in adipose tissue of first-lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 94: 361-369.
- Suomen virallinen tilasto (SVT) 2012: Maidon kokonaistuotanto. <http://www.stat.fi/til/maidkt/index>. Helsinki, Suomi: Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskus, Tike. Viitattu 9.5.2012.
- Tsuchida, A., Yamauchi, T., Ito, Y., Hada, Y., Maki, T., Takekawa, S., Kamon, J., Kobayashi, M., Suzuki, R., Hara, K., Kubota, N., Terauchi, Y., Froguel, P., Nakae, J., Kasuga, M., Accili, D., Tobe, K., Ueki, K., Nagai, R. & Kadowaki, T. 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 30817-30822.

- Vernon, G.R. & Pond, C. M. 1997. Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3: 231-241.
- Vozarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P. A., Bogardus, C. & Pratley, R. E. 2001. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obesity Research* 9: 414-417.
- Wang, J., Obici, S., Morgan, K., Barzilai, N., Feng, Z. & Rossetti, L. 2001. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 50: 2786-2791.
- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., Kotani, K., Quadro, L. & Kahn, B. B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356-362.
- Yeaman, S. J., Smith, G. M., Jepson, C. A., Wood, S. L. & Emmison, N. 1994. The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism. *Advances in Enzyme Regulation* 34: 355-370.
- Yli-Hynnilä, M. 1999. *Nauta* 3: 10-11.
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A. & Zechner, R. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383-1386.

LIITE1 Tutkimuksessa käytetyt alukkeet

| Geeni | Forward-aluke | Reverse-aluke |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>ADIPOQ</i> | GATGGCACCCCTGGTGAGAA | CACCAGTGTCAACCCTTAGGACCA |
| <i>AR1</i> | GGCTCTACTACTCCTTCTAC | ACACCCCTGCTCTTGTCTG |
| <i>AR2</i> | GGCAACATCTGGACACATC | CTGGAGACCCCTTCTGAG |
| <i>HSL</i> | GAGTTTGAGCGGATCATTCA | TGAGGCCATGTTTGCTAGAG |
| <i>IL6</i> | GCGCATGGTCGACAAAATCTC | GCGCATGGTCGACAAAATCTC |
| <i>IRS1</i> | AACCGCAGCCTCCTCCACTC | TGCTGTGATGTCCAGTTGAGCTAC |
| <i>LEP</i> | CTGTGCCCATCCGCAAGGT | CCAGTGACCCTCTGTTTGGAGGA |
| <i>LPL</i> | ACACAGCTGAGGACACTTGCC | GCCATGGATCACCACAAAGG |
| <i>PCK1</i> | CCTGTTGGTGTCCCTCTGGTCTAC | CATGATGACTTTGCCCTTGTACTCC |
| <i>PPARγ</i> | CTTGTGAAGGATGCAAGGGTTTCTT | CCAAACCTGATGGCATTATGAGACA |
| <i>RBP4</i> | TTAAATAACTGGGACGTGTGTGCAG | TTTCTGGAGAAAGGACGCTACGC |
| <i>RES</i> | GAGGTCACCACCTCCCTAGTTCCT | GAAGCCTGAAGGGCAGGTGA |
| <i>SCD</i> | TCCTGTTGTTGTGCTTCATCC | GGCATAACGGAATAAGGTGGC |
| <i>TNFα</i> | CCAGAGGGAAGAGCCAGCAGT | AGAGTTGATGTCTGGCTACAACGTG |

LIITE 2 Näytteenottoajankohtien keskimääräiset ΔC_T -arvot

| | | -8 | SE | +1 | SE | +9 | SE |
|--------------------------------|----------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| <i>ADIPOQ</i> | Koko aineisto | -5,984 | 0,475 | -3,849 | 1,491 | -3,954 | 0,994 |
| | Kontrolliryhmä | -5,991 | 0,681 | -5,302 | 0,533 | -4,245 | 0,780 |
| | Koeryhmä | -5,797 | 0,146 | -2,397 | 1,980 | -3,662 | 1,346 |
| <i>ARI</i> | Koko aineisto | 3,429 | 0,957 | 2,582 | 0,629 | 2,011 | 0,775 |
| | Kontrolliryhmä | 1,513 | 0,898 | 2,380 | 0,431 | 2,930 | 0,682 |
| | Koeryhmä | 1,803 | 1,082 | 2,783 | 0,812 | 1,093 | 0,861 |
| <i>AR2</i> | Koko aineisto | -2,922 | 1,135 | -3,343 | 0,804 | -2,186 | 1,102 |
| | Kontrolliryhmä | -3,357 | 1,006 | -2,068 | 0,766 | -0,186 | 0,914 |
| | Koeryhmä | -2,740 | 1,323 | -1,275 | 0,876 | -2,000 | 1,377 |
| <i>HSL</i> | Koko aineisto | -0,385 | 1,157 | 0,478 | 0,890 | 0,879 | 1,246 |
| | Kontrolliryhmä | -0,788 | 1,087 | -0,307 | 0,471 | 1,301 | 0,946 |
| | Koeryhmä | 0,018 | 1,292 | 1,360 | 1,136 | 0,457 | 1,700 |
| <i>IL6</i> | Koko aineisto | 3,483 | 0,460 | 3,675 | 0,448 | 3,820 | 0,458 |
| | Kontrolliryhmä | 2,970 | 0,435 | 3,553 | 0,380 | 4,250 | 0,394 |
| | Koeryhmä | 3,997 | 0,439 | 3,797 | 0,536 | 3,390 | 0,551 |
| <i>IRS1</i> | Koko aineisto | -1,083 | 0,569 | -0,896 | 0,687 | -0,141 | 0,491 |
| | Kontrolliryhmä | -1,737 | 0,745 | -1,005 | 0,878 | 0,228 | 0,308 |
| | Koeryhmä | -0,429 | 0,141 | -0,788 | 0,498 | -0,510 | 0,677 |
| <i>LEP</i> | Koko aineisto | -2,791 | 0,600 | -0,219 | 0,824 | 0,721 | 1,246 |
| | Kontrolliryhmä | -2,963 | 0,807 | -0,953 | 0,526 | 0,941 | 1,211 |
| | Koeryhmä | -2,619 | 0,346 | 0,516 | 1,019 | 0,502 | 1,537 |
| <i>LPL</i> | Koko aineisto | -3,777 | 1,399 | -1,646 | 0,790 | -2,065 | 1,127 |
| | Kontrolliryhmä | -2,885 | 1,512 | -1,430 | 0,576 | -0,749 | 0,989 |
| | Koeryhmä | -4,669 | 1,312 | -1,862 | 1,004 | -3,382 | 1,260 |
| <i>PCK1</i> | Koko aineisto | -0,447 | 0,571 | 1,653 | 1,153 | 2,730 | 1,058 |
| | Kontrolliryhmä | 0,017 | 0,825 | 2,080 | 0,941 | 2,834 | 0,633 |
| | Koeryhmä | -0,911 | 0,313 | 1,227 | 1,368 | 2,625 | 1,491 |
| <i>PPARγ</i> | Koko aineisto | -2,914 | 0,751 | -2,162 | 1,051 | -1,752 | 0,579 |
| | Kontrolliryhmä | -2,935 | 1,102 | -3,274 | 0,913 | -1,414 | 0,265 |
| | Koeryhmä | -2,893 | 0,082 | -1,050 | 1,096 | -2,090 | 0,850 |
| <i>RBP4</i> | Koko aineisto | -5,970 | 0,787 | -5,868 | 0,845 | -4,468 | 0,785 |
| | Kontrolliryhmä | -5,794 | 1,144 | -6,012 | 1,001 | -3,746 | 0,619 |
| | Koeryhmä | -6,145 | 0,159 | -5,723 | 0,734 | -5,189 | 0,985 |
| <i>RES</i> | Koko aineisto | 7,198 | 0,540 | 6,879 | 0,407 | 4,775 | 1,031 |
| | Kontrolliryhmä | 6,617 | 0,457 | 6,631 | 0,259 | 3,966 | 0,985 |
| | Koeryhmä | 7,779 | 0,569 | 7,127 | 0,523 | 5,583 | 1,201 |
| <i>SCD</i> | Koko aineisto | -5,698 | 1,350 | -1,353 | 0,789 | -0,320 | 1,427 |
| | Kontrolliryhmä | -4,549 | 1,489 | -1,614 | 0,934 | 0,491 | 1,344 |
| | Koeryhmä | -6,842 | 1,162 | -1,093 | 0,676 | -1,132 | 1,736 |
| <i>TNFα</i> | Koko aineisto | 5,725 | 0,488 | 6,184 | 0,545 | 6,005 | 0,615 |
| | Kontrolliryhmä | 5,734 | 0,566 | 6,086 | 0,539 | 6,264 | 0,437 |
| | Koeryhmä | 5,717 | 0,441 | 6,281 | 0,592 | 5,747 | 0,852 |